



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **VEÍCULOS E VETORES EM TERAPIA GÉNICA**

Trabalho submetido por  
**João Filipe Lameirão Paulino**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Professora Doutora Ana Isabel Fernandes**

**Outubro de 2013**



## Índice

Índice de Figuras .....	4
Índice de Tabelas .....	5
Lista de abreviaturas .....	6
Agradecimentos .....	7
Resumo .....	8
<i>Abstract</i> .....	9
1. Evolução e desenvolvimento .....	10
2. Fundamentos da terapia génica.....	13
3. Terapia génica germinativa e somática: duas realidades diferentes .....	15
4. Estratégias: <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i> .....	16
5. Veiculação de genes em terapia génica .....	18
5.1. Vetores virais .....	19
5.1.1. Retrovírus.....	22
5.1.2. Lentivírus .....	25
5.1.3. Adenovírus .....	27
5.1.4. Vírus adeno-associados.....	30
5.1.5. Vírus Herpes- <i>Simplex</i> tipo 1 .....	33
5.1.6. <i>Poxvírus</i> e <i>Alphavírus</i> .....	35
5.2. Vetores não-virais .....	37
5.2.1. Oligodeoxinucleótidos .....	38
5.2.2. Lipoplexos.....	41
5.2.3. Poliplexos.....	44
5.2.4. Regulação da expressão génica em vetores não-virais .....	46
5.3. Vetores híbridos .....	48

6.	Panorama atual da terapia génica.....	51
6.1.	Ensaio clínico desenvolvido.....	52
6.2.	Vetores utilizados.....	53
6.3.	Indicações terapêuticas .....	54
6.3.1.	Cancro .....	55
6.3.2.	Doenças cardiovasculares .....	56
6.3.3.	Doenças monogénicas.....	56
6.3.4.	Outras doenças .....	57
6.4.	Produtos biotecnológicos desenvolvidos .....	58
7.	Problemas e perspetivas futuras.....	61
	Bibliografia.....	66

## Índice de Figuras

Figura 1. Esquema representativo da terapia génica <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> .....	16
Figura 2. Esquema representativo do uso de vetores virais em terapia génica. ....	21
Figura 3. Estrutura dos retrovírus e vetores derivados. ....	23
Figura 4. Estrutura dos lentivírus e vetores derivados ....	26
Figura 5. Estrutura dos adenovírus e das várias gerações de vetores derivados ....	29
Figura 6. Estrutura dos vírus adeno-associados (VAA) e vetores derivados. ....	30
Figura 7. Estrutura do vírus herpes- <i>simplex</i> tipo I e vetores derivados.....	34
Figura 8. Estratégia ODN <i>antisense</i> na supressão da translação do ARNm ....	39
Figura 9. Estratégia ODN <i>decoy</i> na supressão da transcrição de genes ....	40
Figura 10. Formação de lipoplexos e esquema de transfeção ....	42
Figura 11. Formação de poliplexos e esquema de transfeção ....	44
Figura 12. Número de ensaios clínicos usando terapia génica aprovados mundialmente .....	52
Figura 13. Vetores utilizados em ensaios clínicos de terapia génica.....	53
Figura 14. Indicações terapêuticas da terapia génica ....	54

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1. Estrutura e tamanho do genoma de alguns vírus utilizados como vetores em terapia génica.....	19
Tabela 2. Potencialidades da terapia génica no tratamento do cancro .....	55
Tabela 3. Potencialidades da terapia génica no tratamento de doenças cardiovasculares e monogénicas. ....	57
Tabela 4. Potencialidades da terapia génica no tratamento de doenças infecciosas, neurológicas, inflamatórias e oculares.....	58
Tabela 5. Medicamentos usados em terapia génica em estado avançado de desenvolvimento.....	59
Tabela 6. Vítimas de terapia génica.....	62

## Lista de abreviaturas

ADA – Adenosina desaminase  
ADN – Ácido desoxirribonucleico  
ARN – Ácido ribonucleico  
F IX – Fator de coagulação IX  
FT – Fator transcricional  
HEK – *Human Embryonic Kidney*  
iPS – *Induced Pluripotent Stem cells*  
ITR – *Inverted Terminal Repeats*  
LCR – *Locus Control Region*  
LTR – *Long Terminal Repeats*  
MoMuLV – Vírus da Leucemia Murina de Moloney  
SCID – *Severe combined Immunodeficiency*  
VAA – Vírus Adeno-associados  
VEB – Vírus *Epstein-Barr*  
VEV – Vírus da Estomatite Vesicular  
VHJ – Vírus Hemaglutinante do Japão  
VHS – Vírus Herpes-*Simplex*  
VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana  
ODN - Oligodeoxinucleótidos  
PBS – *Primer Binding Site*  
PCL – *Packaging cell lines*  
PEI - Polietilenimina  
PIC – *Pre-Integration Complex*  
PLL – Poli-L-Lisina  
PoliA – Poliadenilana A  
PPT – Polipurina T  
SIN – *Self Inactivating Vector*

## **Agradecimentos**

No percurso de estudo e trabalho que agora termina participaram, direta ou indiretamente, várias pessoas que merecem o meu sincero agradecimento, sem as quais esta monografia não estaria completa.

De modo particular gostaria de agradecer:

À minha orientadora Professora Doutora Ana Isabel Fernandes pela sua dedicada orientação e atenção, pelo constante apoio, exemplo e conselho, pela disponibilidade e compreensão, pelas sábias correções e pelos conhecimentos transmitidos.

À Professora Doutora Deolinda Auxtero pela sua simpatia e colaboração.

À minha namorada, Inês Sousa, pelo apoio e presença ao longo de todo este momento.

Aos Pais.



## **Resumo**

As expectativas de cura que se criaram no que respeita às doenças genéticas residem no facto de atualmente se conhecer bem os genes e respetivas mutações, responsáveis pelas patologias. A sequenciação do genoma humano e o desenvolvimento da técnica do ADN recombinante possibilitaram a substituição ou correção do gene defetivo. A terapia génica foi então equacionada, tendo sido aprovados até hoje em dia mais de 1700 ensaios clínicos em todo o mundo. Estes, não só recolheram nova informação e conhecimento sobre terapia génica como também levaram a perceber o medo que persiste na sociedade relativamente às terapêuticas de índole genética.

A terapia génica consiste na inserção de genes funcionais em células com genes anormais de modo a substituí-los ou complementá-los. Os genes funcionais, também denominados genes terapêuticos, em contacto com o genoma, vão substituir, manipular ou suplementar genes inativos ou disfuncionais causadores de patologia, por intermédio de um veículo (viral ou não viral) com diferentes potenciais e limitações. Mais recentemente os cientistas desenvolveram outra classe de vetores, os vetores híbridos, que visa englobar as vantagens dos sistemas virais e não virais num único sistema vetorial e, principalmente, superar as limitações que surgem com o uso de qualquer um deles.

As diferentes classes de vetores estão a ser intensamente testadas em ensaios clínicos e englobam uma grande gama de alvos-terapêuticos, sendo as áreas das doenças monogénicas, das doenças cardiovasculares e do cancro as que têm apresentado mais sucesso terapêutico.

Para a implementação equilibrada da terapia génica é necessário que se comece pelo tratamento de doenças mais simples, e só depois se passe para o desenvolvimento de terapias para doenças multifatoriais, de modo a alcançar resultados positivos que atraiam maiores investimentos por parte das grandes empresas e incrementem a aceitação desta abordagem terapêutica por parte da comunidade científica e da sociedade em geral.

**Palavras-chave:** Terapia génica; vetores virais; vetores não-virais; gene terapêutico.

## ***Abstract***

The expectations of healing, which have been created in relation to genetic diseases reside in the current knowledge that genes and associated mutations are responsible for diseases. The sequencing of the human genome and the development of the recombinant DNA technique enabled the replacement or correction of the defective gene. Gene therapy was then equated, with the approval up to know of more than 1700 clinical trials worldwide. These not only gathered new information and knowledge about gene therapy but also led to the perception of the fear that persists in society in relation to genetic treatment.

Gene therapy is the insertion of functional genes into cells with abnormal genes in order to replace or supplement them. The functional genes, also termed therapeutic genes, in contact with the genome, replace or supplement genes, which are inactive or dysfunctional and cause of pathology, by means of a vehicle (viral or non-viral) with different potential and limitations. More recently, scientists have developed another class of vectors, the hybrid vectors, with the aim of including the advantages of viral and non-viral vector into a single system and particularly to overcome the limitations that arise with the use of each of them separately.

The different classes of vectors are being extensively tested in clinical trials and include a wide range of therapeutic targets, of which monogenic diseases, cardiovascular diseases and cancer have been the most successful.

For the balanced implementation of gene therapy is necessary to start with the treatment of simpler diseases, and only then proceed to the development of therapies for multifactorial diseases, in order to achieve positive results that attract major investments by large companies and which increase acceptance of this therapeutic approach by the scientific community and the society in general.

**Keywords:** Gene therapy, viral vectors, non-viral vectors , therapeutic gene.

## **1. Evolução e desenvolvimento**

O interesse pelo autoconhecimento foi o início de toda a busca milenar com o objetivo primordial de saber mais acerca do Homem e do seu papel no mundo, sendo a primeira contribuição dada pelos filósofos da antiguidade, que estudaram intensamente a nossa relação com o universo tentando perceber o motivo da existência humana. Séculos mais tarde foi salientada a importância de situar a raça humana na escala evolutiva do nosso planeta, desempenhando o cientista Charles Darwin um papel de destaque, seguido de Sigmund Freud que desenvolveu a área da psicologia. Com o passar dos séculos, e tendo à disposição técnicas e instrumentos cada vez mais eficazes e precisos, foram-se estudando com maior detalhe os órgãos, os tecidos e posteriormente as células e seus constituintes, incrementando o desenvolvimento de outras áreas do conhecimento, nomeadamente a genética, a biologia molecular, a bioquímica e outras ciências microscópicas (Nardi, Teixeira, & Silva, 2002).

Em 1905, surgiu pela primeira vez o termo “*genetics*” com William Bateson e os primeiros trabalhos reveladores na área da genética, observando-se que os genes ocupavam posições semelhantes nos cromossomas de indivíduos diferentes e que estes teriam, possivelmente, cariz hereditário. Em 1941, Beadle e Tatum, comprovaram que cada gene codifica somente uma proteína, controlando a sua atividade e desempenho. Cinco anos depois, Tatum e Lederberg demonstraram que o material genético poderia ser transmitido entre bactérias, indício favorável para o seu uso clínico.

Em 1953, os trabalhos de James Watson e Francis Crick valeram-lhes o prémio Nobel da medicina, com a descoberta da estrutura em dupla hélice do ADN. Estavam então criadas as bases da genética que, na década seguinte, suscitaram interesse, começando a especular-se sobre a possível utilização dos vírus como veículos de transferência de genes de interesse para seres humanos doentes, com o objetivo de reverter e tratar certos estados patológicos de origem genética (Sturtevant & Lewis, 2001).

Na década de 1970, inúmeros trabalhos foram desenvolvidos resultando num grande desenvolvimento na área da genética, nomeadamente o isolamento da primeira enzima de restrição e desenvolvimento da tecnologia do ADN recombinante por Paul Berg, abriram portas à realidade da terapia génica (Linden, 2010).

A ideia de usar as técnicas de ADN recombinante para corrigir o genoma foi inspirada nas doenças causadas por mutação de um único gene, designadas de monogénicas, mas hoje em dia têm potencialidades muito mais extensas. (Chen, He, Shi, & Yang, 2013). Em 1977, Michael Wigler e Richard Axel, tentaram a primeira correção genética em células de mamífero cultivadas *in vitro*, inserindo um gene codificador da timina quinase em células defetivas nesse gene com a utilização de ADN livre, que não mostrou ter grande eficácia. Nesse mesmo ano, Fred Sanger revolucionou o campo da genética com a descoberta da sequenciação do ADN, o que possibilitou um maior conhecimento acerca do genoma (Linden, 2010).

Novas propostas surgiram na década de 80 com a premissa da utilização de vetores virais não patogénicos como veículos de administração de genes, visando a resolução dos problemas de eficácia dos trabalhos anteriores.

Em 1990 foi aprovada a primeira terapia génica somática em humanos, sendo a paciente uma menina de quatro anos de idade que sofria de uma doença genética chamada Síndrome da Imunodeficiência Combinada Severa (SCID, *severe combined immunodeficiency*) causada pela deficiência de uma enzima necessária ao correto desenvolvimento do sistema imunitário, a adenosina desaminase (ADA). Esta mutação deve-se a uma alteração do gene codificador da enzima ADA que leva à degeneração dos linfócitos T, responsáveis pelo controlo das infeções do nosso organismo por microrganismos e partículas externas a este, e, sem tratamento, as crianças morrem com infeções oportunistas antes de alcançarem o primeiro ano de idade. A terapêutica usual é a reposição semanal da enzima ADA por via injetável mas, dado que as crianças desenvolveram reações alérgicas à enzima, o médico William French Anderson, da Universidade do Sul da Califórnia, propôs a terapia génica como alternativa. A terapêutica consistia na colheita de linfócitos T da paciente, adição do gene ADA e proliferação destas células *in vitro*, até serem de novo colocadas na circulação sanguínea (Scollay, 2001). Os resultados observados nesta paciente, e num outro de nove anos com a mesma patologia, foram bastante positivos, observando-se um aumento dos níveis da enzima no sangue. Os resultados não foram considerados um pleno sucesso clínico pois as crianças continuaram a fazer terapêutica enzimática de substituição com ADA, embora com menor frequência. Estes estudos representaram um importante avanço da terapia génica que, hoje em dia, consegue controlar a SCID sem recorrer a injeções enzimáticas (A. Fischer, Hacein-Bey-Abina, & Cavazzana-Calvo, 2013).

Entre 1990 e 2001, foi levado a cabo o projeto de sequenciamento do genoma humano que, aliado a programas informáticos de comparação de genes, constituiu o maior progresso da medicina e da biologia do século XXI, desvendando um universo de possibilidades nunca antes visto (Wirth & Yla-Herttuala, 2013). As expectativas que se criaram com a possibilidade de cura de doenças genéticas residem no facto de agora se conhecer bem os genes e respetivas mutações responsáveis pelas patologias, elucidadas pela sequenciação do genoma humano, e no constante desenvolvimento da técnica do ADN recombinante, que possibilita a substituição ou correção do gene defeituoso (Mac Gabhann, Annex, & Popel, 2010).

Com estes avanços foi possível identificar mais de 70.000 defeitos genéticos em humanos, muitos deles responsáveis por doenças hereditárias e outros estados patológicos (e.g. infeções virais e cancro), para os quais a medicina convencional nem sempre consegue chegar a uma solução, o que poderá ser possível com o desenvolvimento da terapia génica (Menck & Ventura, 2007).

## 2. Fundamentos da terapia génica

Mutações em genes codificantes de proteínas estruturais são a causa das anomalias de índole tecidual. Através da introdução no organismo do gene não mutado, funcionalmente ativo, é possível recuperar a sua atividade normal de forma a evitar a produção de proteínas deficientes e tóxicas para o organismo. A terapia génica, ou terapia genética, é então o tratamento baseado na transferência de material genético para células específicas do paciente (Kundu & Sharma, 2008).

Esta tecnologia, ainda em aperfeiçoamento, consiste na inserção de genes funcionais em células com genes anormais para substituir ou complementar esses genes causadores de doença. Os genes funcionais, também denominados genes terapêuticos, em contacto com o genoma, vão substituir, manipular ou suplementar genes inativos ou disfuncionais causadores de patologia, por intermédio de um veículo, viral ou não viral, concebido para o efeito (Veiga, Araujo, & Cardozo, 2009).

Vários procedimentos técnicos são necessários à prática segura da terapia génica em humanos. O primeiro passo é o isolamento do gene anómalo e sequências reguladoras, para saber quais as propriedades do gene e quais os mecanismos associados à sua correta expressão e regulação. Seguidamente, deve determinar-se quais as células-alvo, ou seja, quais as células que refletem a anomalia genética, para posterior desenvolvimento de um vetor eficiente. Este deve ser específico para determinadas células de modo a não inserir informação genética exógena em células que não contenham genes defeituos. É imprescindível monitorizar-se exaustivamente todos os procedimentos, técnicas e veículos utilizados de modo a evitar efeitos adversos indesejáveis (Mammen, Ramakrishnan, Sudhakar, & Vijayalakshmi, 2007). Para confirmar a resolução dos problemas de segurança e utilidade da terapêutica são feitos estudos *in vitro* e em animais, seguindo-se os estudos clínicos: a fase I inclui ensaios de segurança com o produto génico num pequeno número de indivíduos (6 a 10); a fase II testa a eficácia do protocolo e engloba um número maior de pacientes; a fase III utiliza uma amostra considerável de doentes de modo a estabelecer completamente as questões relacionadas com a segurança e eficácia; a fase IV, é a última etapa clínica, constituída pela vigilância e reporte de efeitos adversos (Lundstrom & Boulikas, 2003).

Inicialmente a terapia génica, baseada na técnica do ADN recombinante, destinava-se a tratar doenças hereditárias monogénicas como a hemofilia e outras doenças metabólicas, modificando diretamente o gene responsável pela doença. Com os

avanços conseguidos pode agora ser usada em doenças mais complexas e multifatoriais, adquiridas após o nascimento, como é o caso do VIH e da doença de Parkinson, através da modulação génica dos genes anormais que estão direta ou indiretamente associados à causa da doença, com estimulação dos mecanismos de reparo e de regeneração (Wirth & Yla-Herttuala, 2013). Pode igualmente ser utilizada em imunoterapia para patologias de causa infecciosa e em tratamentos oncológicos, com a indução da morte celular seletiva em células hiperproliferativas (Marsh, Goldfarb, Shafman, & Diaz, 2013).

A terapia génica pode ser usada como marcador antigénico de determinadas células de modo a desencadear uma resposta imunitária, ou mesmo fazer parte de um protocolo de marcação e diagnóstico de estados patológicos hereditários (Dani, 2000).

Uma técnica específica derivada da terapia génica é a vacina de ADN, que consiste na injeção direta de um gene codificador de uma proteína típica do agente agressor, estimulando a produção de uma resposta imune profilática, semelhante às vacinas virais (Raviprakash & Porter, 2006).

Os problemas inerentes ao uso da terapia génica podem advir de uma resposta imunitária agressiva à proteína produzida pelo gene inserido, ou da expressão exagerada do gene terapêutico (*overexpressed gene*), levando a um excesso da proteína antes defeituosa. A mutagénese insercional pode igualmente constituir um problema uma vez que o gene não se insere corretamente no local de ligação, ou através desta mutação pode haver, acidentalmente, a entrega celular de genes não terapêuticos. Outros problemas a ter em conta com esta terapêutica são a acessibilidade do gene às células-alvo, a proporção de células que recebe efetivamente o gene terapêutico e a continuidade da expressão do gene introduzido (Hackett, Largaespada, Switzer, & Cooper, 2013).

Os vetores utilizados têm de ser o mais específicos possível para que não atinjam células não afetadas pelo defeito genético e provoquem alguma anomalia nas células saudáveis. Deve ter-se em conta que os vetores virais constituem um risco natural por haver a possibilidade destes conseguirem reverter a sua inocuidade e se tornarem patogénicos e contagiosos (Deakin, Alexander, Hooker, & Kerridge, 2013).

Com o grande leque de possibilidades terapêuticas e das inúmeras aplicações clínicas e laboratoriais da terapia génica é de extrema importância o desenvolvimento de veículos de administração e veiculação celular específicos e seguros para serem administrados aos humanos sem resultarem em efeitos prejudiciais à saúde.

### **3. Terapia génica germinativa e somática: duas realidades diferentes**

A terapia génica de células somáticas é, do ponto de vista ético, considerada comparável ao transplante de órgãos entre humanos, visando melhorar uma função que o organismo não consegue executar corretamente. Este tipo de tratamento envolvendo a manipulação genética de células somáticas não é transmissível à descendência, pelo que não altera o código genético, apenas corrige os genes das células “anormais”. O gene de interesse ao ser transferido para a célula somática por intermédio de um vetor, vai ser inserido no núcleo desta, observando-se o efeito terapêutico, ampliado pela multiplicação própria deste tipo de células (Kustikova, Brugman, & Baum, 2010). As células proliferativas são preferencialmente utilizadas de modo a que os vetores consigam integrar o gene no ADN celular enquanto este se replica. As células estaminais são as melhores candidatas à terapia génica, contudo são bastante difíceis de isolar e manipular; daí já se terem começado a usar células epidérmicas, endoteliais vasculares, hepáticas e linfócitos, apesar de terem um ciclo de vida menos duradouro (Carey & White, 2003).

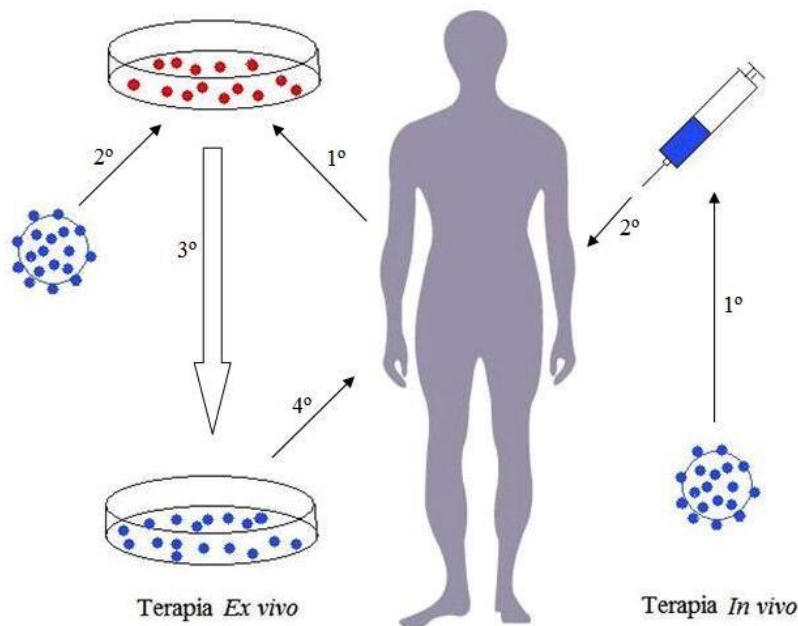
Já a terapia génica de células germinativas, ou seja a manipulação genética do zigoto ou dos gametas que lhe dão origem, consiste em mudanças definitivas não só no genoma do paciente mas também dos seus descendentes, o que do ponto de vista ético levanta alguns problemas. Um deles é o próprio facto de modificar definitivamente o património genético; outro decorre da possibilidade de ocorrerem danos na saúde advindos de falhas de procedimentos técnicos ou procedimentos inerentes à própria transferência do ADN, totalmente desconhecidos no que se refere ao seu resultado em humanos (Deakin, Alexander, & Kerridge, 2010).

Alguns problemas desencorajam a utilização destas células na terapia génica: os embriões normalmente morrem ou desenvolvem tumores e malformações quando injetados e, mesmo numa doença autossómica dominante, metade dos embriões têm a probabilidade de nascer normais, sendo mais simples desenvolver a tecnologia para isolar os embriões saudáveis e implantá-los no útero do que alterar os que se apresentam defeituosos (Carey & White, 2003).



#### 4. Estratégias: *in vivo* e *ex vivo*

A terapia génica pode ser utilizada com base em duas estratégias distintas: *in vivo* e *ex vivo*, dependendo se o gene é colocado diretamente no organismo do paciente, ou é inserido laboratorialmente em células isoladas e posteriormente introduzido novamente no indivíduo, respetivamente (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema representativo da terapia génica *ex vivo* e *in vivo*. Terapia *ex vivo*: 1º colheita e cultura *in vitro* das células do paciente; 2º transdução com um vetor que transporta o gene terapêutico; 3º seleção e expansão das células com o gene terapêutico; 4º reintrodução das células no paciente. Terapia *in vivo*: 1º formulação apropriada do vetor com o gene terapêutico; 2º injeção direta do vetor no tecido-alvo do paciente. Adaptado de Menck *et al.* (2007)

A terapia *in vivo* é a estratégia mais comum e desenvolvida que utiliza veículos virais ou não-virais de veiculação do gene terapêutico no sangue e tecidos-alvo com administração direta no paciente, ou seja, as células são tratadas dentro do corpo. Uma das potencialidades deste tipo de abordagem é a elevada distribuição que os veículos conferem ao gene terapêutico, propagando-o por várias células, ao contrário da estratégia *ex vivo*. Os veículos são específicos de cada tecido dependendo dos recetores

membranares das células-alvo em questão, no caso dos vetores virais, ou das suas propriedades químicas, no caso dos vetores não virais (Hida et al., 2011). O uso de veículos virais e não virais na terapêutica génica *in vivo* tem vantagens e desvantagens que serão abordadas em detalhe mais adiante.

A terapia *ex vivo* consiste, na maioria dos casos, na extração de células somáticas hematopoiéticas, ou células estaminais, pluripotentes, provenientes da medula óssea do paciente, e manipulação genética em laboratório, usando vetores para nelas inserir o gene. Posteriormente estas células, incorporando o gene terapêutico, são repostas nos tecidos ou órgãos lesados por infusão ou injeção. O resultado terapêutico é conseguido pela introdução do gene terapêutico que repõe ou modula a atividade de um gene defetivo, responsável pela patologia, reprogramando e repondo as atividade das células degeneradas, visando o incremento da neuroprotecção, modulação da inflamação e reposição das proteínas defetivas. Neste procedimento, os efeitos adversos são menos observáveis e o tratamento mais direcionado a um órgão ou conjunto de órgãos específicos, comparativamente ao método *in vivo*, sendo considerado por isso mais seguro. Contudo, neste caso, apenas as células manipuladas, têm o gene terapêutico, já que não há troca de material genético entre células. Quando o tecido-alvo é de difícil acesso (*e.g.* tecido cerebral) recorre-se à terapêutica *in vivo* (Das, Mukhopadhyay, & De, 2011).

Têm sido alcançados resultados satisfatórios nos ensaios pré-clínicos utilizando esta abordagem terapêutica em patologias do sistema ocular como a cegueira, glaucoma e degeneração da retina e da córnea, condições clinicas com elevada prevalência e que diminuem drasticamente a qualidade de vida das pessoas afetadas (Gregory-Evans, Bashar, & Tan, 2012).

Uma hipótese que surgiu em 2012, e atualmente ainda em desenvolvimento primário, foi a hipótese de induzir a pluripotência *in vivo*, com o benefício da administração direta da sequência de genes de reprogramação celular nos tecidos ou órgãos alvo. Estas células seriam então transduzidas no seu ambiente natural, que fornece todas as moléculas e fatores necessários à sua fisiologia, ausentes nos ensaios *in vitro* (Gardlik, 2012).

## **5. Veiculação de genes em terapia génica**

A técnica do ADN recombinante é indispensável à observação de resultados terapêuticos positivos. Contudo, o desenvolvimento de vetores eficazes na entrega do gene terapêutico no local alvo é imprescindível à execução eficaz e segura da terapia génica, constituindo o maior obstáculo à aplicação clínica desta terapêutica (Linden, 2010).

As características hidrofóbicas e apolares das membranas celulares e a composição dos fluidos endoplasmáticos constituem uma barreira fortemente limitante da entrada de grandes moléculas como o ADN e ARN. De facto, os ácidos nucleicos livres, *naked* ADN/ARN, na sua grande maioria, dificilmente entram no interior das células a partir do meio extracelular. Essa dificuldade é benéfica para o organismo, pois dificulta alterações errantes do metabolismo celular e propagação de erros de transcrição entre células (Veiga et al., 2009).

Para facilitar a entrega de ADN exógeno às células podem ser utilizados vários meios de transferência génica, podendo estes ser físicos (como o caso da eletroporação e injeção a altas pressões), químicos (tal como o uso de lípidos e polímeros), ou biológicos (com recurso a vírus). Há, assim, necessidade de um veículo que facilite a entrada do ADN nas células vivas, que neste contexto se denomina de “vetor” (Iwami, Natsume, & Wakabayashi, 2010).

Um vetor pode ser descrito como sendo um sistema que integra várias funções: entrega de genes terapêuticos nas células-alvo, proteção contra a degradação dos genes a transportar e segurança na transcrição destes no interior das células. Para além disto, os vetores devem ser passíveis de se aplicar clinicamente no doente, terem um baixo custo e serem fáceis de manusear e purificar em elevadas concentrações (Warnock, Merten, & Al-Rubeai, 2006).

Os vetores normalmente utilizados como veículos em terapia génica podem ter origem viral ou não viral. O termo utilizado para a inserção do gene de interesse na célula por um intermédio de um vetor viral é transdução génica, sendo exemplos deste tipo de vetor os retrovírus, os adenovírus e os vírus adeno-associados. Quando o vetor é de origem não viral, tal como os plasmídeos e os lipossomas, o termo usado para a inserção do gene terapêutico é transfeção génica (Dani, 2000).

Mais recentemente têm vindo a ser desenvolvidos vetores híbridos, com componentes plasmidiais e virais, ou virais e não virais (Huang & Kamihira, 2013), visando conjugar as vantagens de diferentes tipos de vetores, o que será abordado mais à frente no trabalho.

## 5.1. Vetores virais

A escolha e desenvolvimento deste tipo de veículos reside no facto destes utilizarem os mecanismos de infeção naturais e sobredesenvolvidos dos vírus na entrega genética, manipulando-os de forma a não constituírem riscos para a saúde dos pacientes, apenas transportando e introduzindo os genes de interesse, de modo a promover eficazmente a cura de doenças (Menck & Ventura, 2007).

Uma partícula viral pode ser considerada, à escala nano, um plasmídeo composto por ácido nucleico e proteínas que impedem a sua degradação no meio extracelular, e medeiam a sua internalização nas células-alvo (Giacca & Zacchigna, 2012).

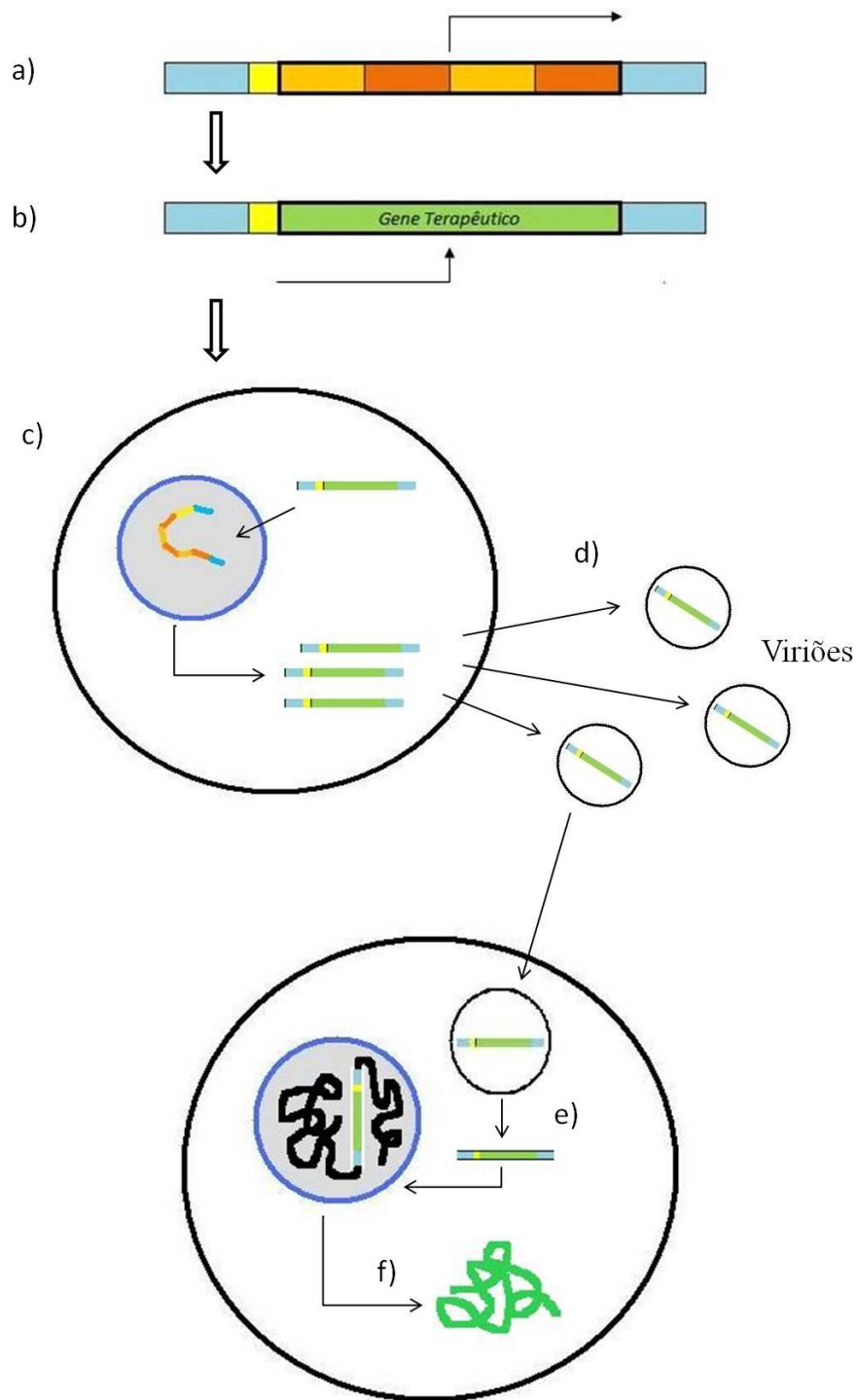
**Tabela 1.** Estrutura e tamanho do genoma de alguns vírus utilizados como vetores em terapia génica. Adaptado de Carey *et al.* (2003).

Vírus	Genoma		Número de Genes
	Estrutura	Tamanho (kb)	
Adenovírus	ADN dupla cadeia	36.0	30
Vírus Influenza	ARN cadeia linear segmentada	22.0	12
Parvovírus	ADN cadeia linear	1.6	5
Poliovírus	ARN cadeia linear	7.6	8
Retrovírus	ARN cadeia linear	6.0 - 9.0	3
SV 40	ADN dupla cadeia circular	5.0	5
Vírus <i>vaccinia</i>	ADN dupla cadeia circular	240	240

Os vetores virais são usados para transferir genes terapêuticos para as células-alvo modificando-os com deleções dos genes essenciais que permitem a replicação, *assembling* (montagem) e infecção. Esses genes deletados podem ser então substituídos por genes terapêuticos para constituir o genoma do vetor terapêutico, variando o tamanho máximo da sequência génica a transportar com a dimensão do genoma viral (Tabela 1).

Um vírus defetivo em termos de replicação assegura a sua segurança na administração *in vivo*. No entanto, para se observarem efeitos terapêuticos os vírus têm que ser produzidos em grandes quantidades. Como os vetores defetivos não têm a capacidade de se reproduzir nas células-alvo, foi necessária a criação de linhagens celulares especiais para ampliar a carga viral e aumentar o interesse terapêutico dos vetores virais. São as denominadas linhagens celulares de empacotamento, *packaging cell lines* (PCLs), que restabelecem as funções dos genes deletados e permitem a produção de vetores terapêuticos recombinantes, e posteriormente de viriões contendo o gene terapêutico (Warnock et al., 2006) (Figura 2).

Para produzir vetores ativos, um vetor defetivo, por exemplo pela deleção do gene da proteína da cápside, é introduzido nas PCLs, onde a enzima replicase, presente no vírus, assegura a produção de várias cópias do genoma do vetor defetivo. O gene da proteína da cápside, presente no genoma das células de empacotamento, é transcrito e o mARN resultante leva à produção da proteína da cápside, que vai permitir a produção de clones não replicativos do vírus. Este processo em que o gene deletado é suplementado por uma proteína codificada no genoma das PCLs é denominado de complementação, ou *trans*-complementação (Gardlik et al., 2005). As PCLs transportam os genes necessários à replicação dos elementos virais na posição *trans*, virtualmente separados dos constituintes virais, enquanto os vetores transportam o gene terapêutico e as sequências necessárias na posição *cis*. Os vetores virais recombinantes não se replicam nem produzem partículas virais depois da transdução das células-alvo pois não codificam os genes *trans* necessários à replicação, tendo esta união complementar um papel fulcral na criação de vetores virais seguros e eficazes (Auman, 2010; Giacca & Zacchigna, 2012).



**Figura 2.** Esquema representativo do uso de vetores virais em terapia gênica. (a) Os genes patogênicos do vírus são removidos e (b) é adicionado o gene terapêutico. (c) Posteriormente, os vetores são introduzidos nas PCLs, que complementam o vetor com os genes necessários à replicação. (d) Os vetores são então libertados das PCLs sob a forma de viriões que depois são veiculados para as células-alvo. (e) No caso de ser veiculado um viriônio com ARN, este sofre transcrição reversa para ADN e integra-se no núcleo da célula, (f) expressando o produto terapêutico.

Os vetores virais formados nas PCLs são libertados sob a forma de viriões que, aquando incubados nas células-alvo, permitem a inserção das cópias do gene terapêutico na célula. Uma vez integrado no ADN celular, o gene inserido produz o efeito terapêutico desejado (Carey & White, 2003).

Apesar do vasto leque de possibilidades terapêuticas e vantagens dos vetores virais, o uso deste tipo de vetores não é cem por cento seguro, já que não é possível eliminar-se na totalidade as interações erráticas entre o genoma viral e o genoma das células-alvo. No processo de recombinação, o vírus pode recuperar a sua capacidade de se multiplicar e perder o gene terapêutico constituindo um grande risco quando administrado ao paciente (Sack & Herzog, 2009).

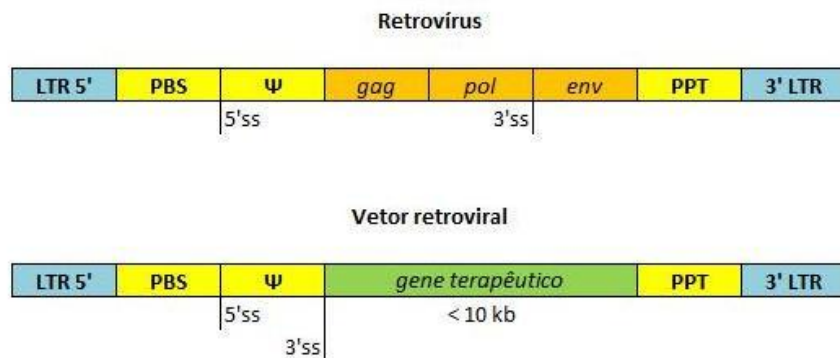
Os vírus dividem-se em duas classes: os não-líticos, como os retrovírus e os lentivírus, que produzem viriões na membrana celular das células infetadas, deixando a célula-alvo intacta; e os líticos, como os adenovírus e herpesvírus, que destroem as células hospedeiras depois de se replicarem e libertarem viriões. Estas características líticas influenciam a escolha do vetor ideal para veiculação do gene de interesse às diferentes células-alvo (Davison & Bhella, 2007).

Os vetores virais, apesar de alguns problemas de segurança e reprodutibilidade, são o método de veiculação mais utilizado clinicamente para veicular genes terapêuticos (Lentz, Gray, & Samulski, 2012).

### 5.1.1. Retrovírus

Os vírus da família *Retroviridae*, denominados também por gama-retrovírus, foram os primeiros a serem testados em aplicações de terapia gênica, tendo sido o vírus da leucemia murina de *Moloney* (MoMuLV) o primeiro sistema vetorial desenvolvido. Os vírus desta família são compostos por uma pequena molécula de ARN e replicam-se através de um ADN intermediário/complementar (ADNc). O seu genoma é composto por genes regulatórios de integração e promoção da transcrição do provírus, denominados LTRs (*long terminal repeats*) e genes *gag* (codificador da proteína da cápside), *pol* (codificador da enzima transcriptase reversa) e *env* (codificador do envelope viral). A dimensão total do seu genoma é de 10kb (Miller, 1992).

Vários elementos gênicos são necessários para o ciclo replicativo destes vírus, e portanto, igualmente necessários à produção de vetores deles derivados, dos quais se destacam as regiões 5'U3, R e 3'U5 dos LTRs que têm um papel importante na transcrição do ARN, formação da transcriptase reversa e poliadenilação, respectivamente; o *primer binding site* (PBS), necessário à ligação do tRNA ao *primer* da transcriptase reversa; as regiões de *splicing* (5ss e 3ss), necessárias à formação do envelope viral; o sinal de empacotamento ( $\Psi$ ), necessário à inclusão do mRNA do genoma viral no interior dos viriões; e a polipurina PPT, enzima necessária à iniciação da atividade da transcriptase reversa (Cornetta, Pollok, & Miller, 2008b).



**Figura 3.** Estrutura dos retrovírus e vetores derivados.

Tal como todos os sistemas vetoriais, o uso destes vírus baseia-se em técnicas de ADN recombinante, onde os genes *gag*, *pol* e *env* são removidos e substituídos por um gene, ou vários genes, de interesse, restando apenas alguns dos elementos regulatórios originais (Figura 3). Por outras palavras, apenas os elementos descritos no parágrafo anterior têm obrigatoriamente de ser mantidos, todos os outros genes, inclusivamente sequências codificadoras de proteínas virais, são removidos para inclusão de genes exógenos com propriedades terapêuticas (Cornetta et al., 2008b).

Conforme referido anteriormente, para a produção dos vetores retrovirais contendo o gene de interesse, dado os vírus serem defetivos em genes imprescindíveis à replicação viral, são utilizadas PCLs contendo os genes *gag*, *pol* e *env* incorporados no seu genoma (Dani, 2000).



Uma vez transfetados para as PCLs, os plasmídeos que contêm os vetores retrovirais começam a ser transcritos no LTR 5', gerando um mRNA com toda a informação proviral mais o sinal de empacotamento. A presença deste sinal de empacotamento permite o reconhecimento do mRNA pelo *gag*, permitindo a sua inclusão num virião infeccioso, que expressa à superfície o gene *env*. Após infeção da célula-alvo, a transcriptase reversa e as sequências PBS e PPT procedem à transcrição do genoma viral. O ADN resultante, ADN complementar, é então integrado no genoma da célula-hospedeira através da integrase, também presente no virião. Uma vez integrado, o mRNA expresso no vetor proviral já não é infeccioso dado que mais nenhuma proteína retroviral está presente. Os vetores retrovirais só são então capazes de um único ciclo de infeção (Cornetta, Pollok, & Miller, 2008a).

Os vetores que contêm os genes terapêuticos podem transfetar as linhagens celulares de empacotamento durante a produção dos vetores recombinantes, ou viriões, que por sua vez podem veicular o transgene às células-alvo, mas não podem despoletar uma infeção. Os viriões podem assim ser produzidos nas PCLs e a seguir purificados para serem injetados no paciente (terapia génica *in vivo*) ou postos em contato com células colhidas do paciente e mantidas em condições de cultivo celular (terapia génica *ex vivo*) sem constituir riscos para o doente (Bogoslovskaja, Glazkova, Shipulin, & Pokrovskii, 2012).

Estes vetores têm a capacidade natural de entrar nas células-alvo e, por meio da transcriptase reversa, transcrever o seu ARN em ADN, integrando-se estavelmente no cromossoma da célula como resultado da presença das sequências regulatórias retrovirais remanescentes. Esta integração, que faz com que as sequências virais se mantenham mesmo durante a divisão celular, constitui uma vantagem terapêutica quer em doenças agudas quer em doenças crónicas. Da integração pode igualmente ocorrer uma expressão exacerbada do gene terapêutico constituindo, paralelamente ao benefício, um risco (Gabriel, Schmidt, & von Kalle, 2012). Quando integrado, o gene inserido pode ser expresso para produzir o efeito terapêutico desejado. Contudo, devido ao vetor retroviral ser desprovido dos genes para a replicação viral, não se replica, não sendo capaz de produzir novos vírus competentes dentro da célula alvo e levar a sobreinfeções (Bogoslovskaja et al., 2012).

As principais limitações dos retrovírus são o facto de não se conseguirem títulos elevados de vetores (cerca de  $10^7$  partículas virais/ mL), as partículas virais serem instáveis e difíceis de concentrar e mostrarem uma baixa eficácia de transfeção *in vitro*

(Gardlik et al., 2005). Observou-se que as partículas virais só infetam células proliferativas, não transfetando as células pós-mitóticas. Contudo, a aplicação deste vetores parece eficaz na terapêutica gênica *ex vivo*, nomeadamente em células estaminais da medula óssea e linfócitos do sangue periférico (van der Loo et al., 2012).

A especificidade dos vetores retrovirais pode ser alcançada com a manipulação dos genes codificadores das proteínas do envelope viral, genes *env*, criando um ligando específico de um recetor tecidual, ou célula-alvo. Através de estudos clínicos foi concluído que o tropismo deste tipo de vetores pode ser aumentado com a substituição das proteínas do envelope viral por outras proteínas membranares, observando-se uma melhor fusão entre os viriões e as células-alvo (Gardlik et al., 2005). Uma proteína eficaz para estes propósitos é a proteína G do vírus da estomatite vesicular (VEV-G), um vírus ARN envelopado, pertencente à família *Rhabdoviridae*. Estas proteínas VEV-G têm uma elevada eficiência na infeção por ligação aos fosfolípidos membranares de todas as células humanas e, conseqüentemente, aumentam a endocitose das partículas virais. Esta facilidade de infeção, como seria de esperar, pode igualmente acarretar riscos de sobreinfeção ou de sobreexpressão do gene terapêutico (von Laer et al., 2000). Uma vez no interior da célula-alvo, o pH ácido ativa as propriedades fusogénicas da VEV-G e o envelope viral funde, libertando os viriões para o citosol. Dadas estas propriedades de fusão, o ciclo replicativo só acontece uma única vez. Para a produção destes vetores retrovirais pseudotipados VEV-G, as PCLs apenas expressam os genes *gag* e *pol*, e usa-se um plasmídeo auxiliar que expressa o gene VEV-G juntamente com o vetor retroviral transportador de genes terapêuticos (Lo & Yee, 2007).

Em contraste com os viriões retrovirais originais, os viriões VEV-G podem ser purificados por centrifugação sem perder a sua capacidade infecciosa, em títulos altos: cerca de  $10^9$  partículas virais/ mL (Gardlik et al., 2005; Sinn, Sauter, & McCray, 2005).

### 5.1.2. Lentivírus

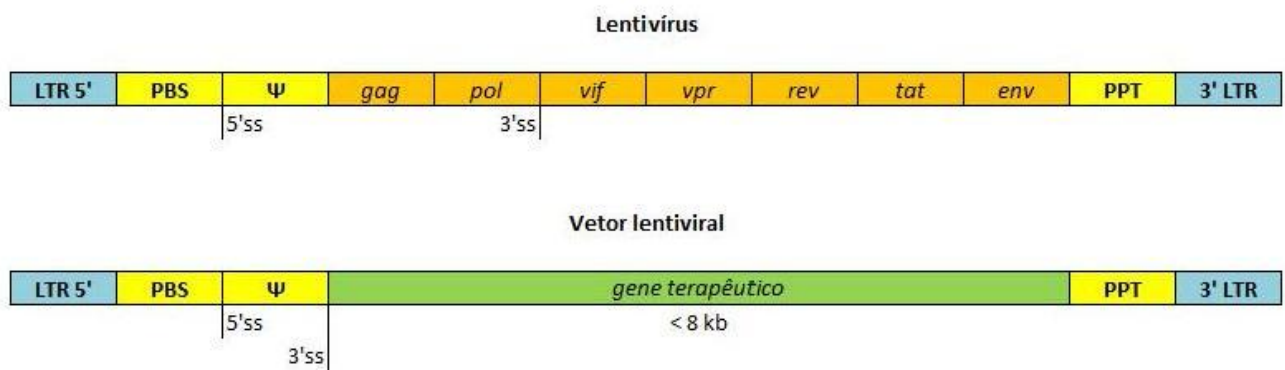
Os lentivírus diferem dos gama-retrovírus especialmente pela capacidade que têm em infetar células não replicativas. Esta característica deve-se a um complexo de pré-integração (*pre-integration complex*, PIC), formado no citosol, que atravessa a membrana nuclear através da interação das suas proteínas constituintes (integrase,

matriz e *vpr*) com as proteínas dos poros nucleares. Tal capacidade tem grande interesse em terapia gênica já que aumenta o leque de linhagens celulares que podem usufruir dos benefícios desta terapêutica, uma vez que a maioria das células do nosso organismo não se replica ativamente (Suzuki & Craigie, 2007).

No caso das células estaminais hematopoiéticas, a transdução *ex vivo* com vetores derivados de lentivírus parece ser eficaz na ausência de estimulação com fatores de crescimento, permitindo a manutenção da pluripotência das células.(Chang & Sadelain, 2007).

Foram estas propriedades especiais que estimularam o interesse na criação de vetores baseados em lentivírus, como o vírus HIV-1 (vírus modelo desta família), e usá-los como veículos de transferência gênica *in vivo* e *ex vivo* (Schambach & Baum, 2008).

Estes vírus são constituídos pelos genes *gag*, *pol* e *env*, presentes noutros vírus, e outros genes acessórios necessários aos diferentes estágios do ciclo de vida viral nomeadamente a transcrição (*tat*), o transporte do mRNA para fora do núcleo (*rev*), a regulação do ciclo celular (*vpr*) e a modulação da infecciosidade dos viriões (*vif*) (Escors & Breckpot, 2010; Schambach & Baum, 2008).



**Figura 4.** Estrutura dos lentivírus e vetores derivados

Ao longo dos anos, várias gerações de vetores lentivirais foram produzidas, omitindo sucessivamente mais genes do genoma do vírus original, visando um aumento de segurança aquando administração clínica. A terceira geração de vetores derivados do

HIV-1 é a geração atualmente usada, apenas possui 3 dos genes do vírus HIV-1 selvagem, e permite uma introdução de genes até 8 kb (Figura 4) (Manilla et al., 2005).

A produção destes vetores requer o uso de um total de quatro plasmídeos. É necessário um vetor com o gene terapêutico inserido no seu genoma, no qual a região LTR3' U3 é deletada para inativar a transcrição do ADN proviral depois da transcrição reversa, sendo denominado vetor SIN (*self-inactivating vetor*). Um plasmídeo de empacotamento, com os genes *gag* e *pol*, é também utilizado, associado com um plasmídeo que possui o gene *rev*, necessário ao transporte para o citosol do mRNA expresso no plasmídeo de empacotamento. Por último, é utilizado um plasmídeo codificante da proteína VEV-G, que aumenta o tropismo viral, à semelhança do que acontece nos vetores retrovirais (Manganini et al., 2002; Sinn et al., 2005)

Os vetores com o gene terapêutico são transfetados juntamente com os restantes plasmídeos para células HEK 293T (*human embryonic kidney*) e são depois purificados como acontece com os vetores gama-retrovirais (Sinn et al., 2005).

### 5.1.3. Adenovírus

Os adenovírus são vírus não envelopados, compostos por um genoma de dupla-cadeia de ADN linear com 36 kb que codifica cerca de 50 proteínas virais, encapsulado numa cápside icosaédrica de 70-100 nm de diâmetro. É na região da cápside que o vírus interage com os recetores celulares, por intermédio das espículas, de modo a infetar as células. São conhecidos mais de 50 serotipos de adenovírus, sendo os serotipos 2 e 5 os mais frequentemente utilizados em terapia génica (St George, 2003).

Ao contrário dos retrovírus, os adenovírus infetam eficazmente todos os tipos de células do hospedeiro, independentemente do seu estado de divisão, apesar da sua integração no interior da célula só acontecer com títulos virais altos (Dani, 2000).

Estes vetores sofreram grandes modificações ao longo dos anos, tendo sido divididos em três gerações, com ordem decrescente de riscos para a saúde (classificação semelhante à dos lentivírus). Os adenovírus de primeira geração apenas contêm uma deleção da região E1, responsável pela ativação da síntese do ADN e expressão viral, que apesar de impossibilitar a produção de partículas infecciosas nas células alvo, tem efeitos citopáticos elevados. A segunda geração adenoviral, acrescida à deleção da

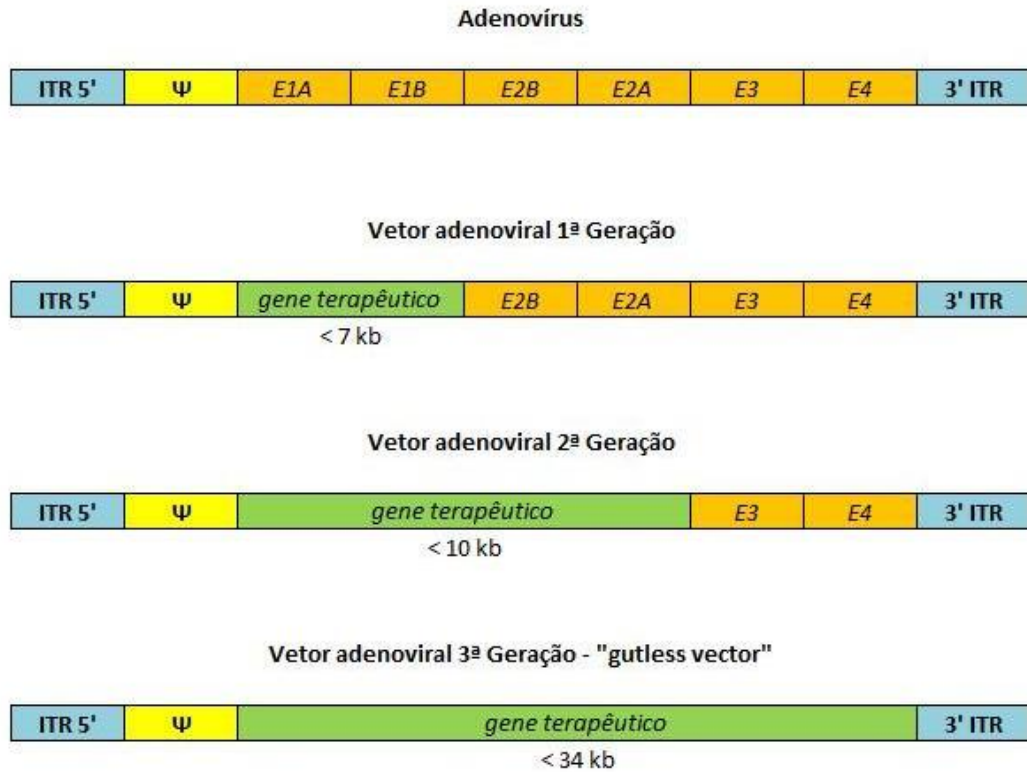
região E1, apresentam também a deleção da região E2 ou E4, com diminuição do efeito citopático a curto prazo (Dani, 2000).

Com o avanço da percepção acerca da recombinação génica e mecanismos virais, é possível produzir vetores adenovirais, contendo um número cada vez menor de sequências adenovirais originais, que permitem a inserção de sequências génicas de dimensões maiores. Os adenovírus de terceira geração, os “*gutless vectors*”, contêm apenas ITRs (*inverted terminal repeats*) e o sinal de empacotamento, o que lhes confere uma imunogenicidade muito baixa e uma replicação só possível se complementados por PCLs (

Figura 5). Estes vetores *gutless* são úteis na veiculação de genes de maiores dimensões como o gene da distrofina (Volpers & Kochanek, 2004).

A expressão génica viral ocorre de um modo ordenado e dirigido, da porção ITR 5' para a ITR 3', sendo esta expressão transativada pelos genes E1A e E1B, localizados na porção inicial do genoma adenoviral e, assim, o vírus será transcrito na célula hospedeira. A remoção destes dois genes faz com que o vírus fique defetivo, não se conseguindo replicar. Na porção do genoma viral removida pode proceder-se à inserção de um gene terapêutico. Outra porção viral que pode ser removida é a região E3, envolvida na capacidade do vírus escapar ao sistema imunitário, que pode ser igualmente substituída por uma porção de ADN exógeno, possibilitando a inserção de porções maiores de material genético de interesse (St George, 2003).

Depois de possuir o gene de interesse inserido nas regiões deletadas, como o adenovírus é defetivo, necessita de sistemas celulares auxiliares de empacotamento, à semelhança dos outros sistemas virais, que o transcomplementem e possibilitem a sua replicação (Gardlik et al., 2005). A internalização dos adenovírus nas PCLs é mediada pela interação entre uma proteína da cápside (182kDa) e o recetor das células de empacotamento, específicos de adenovírus (e *coxsackie* vírus), e pela interação entre uma porção da base viral pentada e as integrinas celulares. A transferência de informação génica dirigida a determinadas células pode ser alcançada através da modificação das proteínas da cápside, bases pentadas ou integrinas, de modo a que os adenovírus recombinantes reconheçam recetores celulares diferentes e transduzam o gene exógeno exclusivamente num tipo de células (Silman & Fooks, 2000).



**Figura 5.** Estrutura dos adenovírus e das várias gerações de vetores derivados. Os vetores adenovirais de 1ª geração apenas têm deleções na região E1, os de 2ª geração podem ter deleções em E1/E2 ou em E1/E4 e os de 3ª geração, denominados vetores *gutless*, só são constituídos por genes indispensáveis, apresentando deleções em E1/E2/E3/E4.

A administração do vírus, para produzir efeito terapêutico, só acontece após um processo de purificação que separa a forma selvagem e patogénica (*wild-virus*) da forma terapêutica do vírus, com as deleções e os genes terapêuticos inseridos (Veiga et al., 2009). Os viriões, resultantes dos vetores adenovirais, clonados em PCLs HEK 293, são purificados por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio (CsCl), ou por cromatografia e, assim, concentrados em suspensões com título elevado ( $10^{10}$  -  $10^{11}$  partículas virais/ mL), podendo ser congelados por períodos prolongados sem perda de atividade (Silman & Fooks, 2000).

Dado o grande tropismo para células do trato respiratório e gastrointestinal, e a prevalência dos adenovírus no dia-a-dia, a quase totalidade dos seres humanos adultos já foi exposta alguma vez na vida a este agente infeccioso, causador de gripes, conjuntivites e gastroenterites. É então comum o sistema imunitário, nomeadamente as células mediadoras inflamatórias B e T, já estarem sensibilizadas contra estas infeções

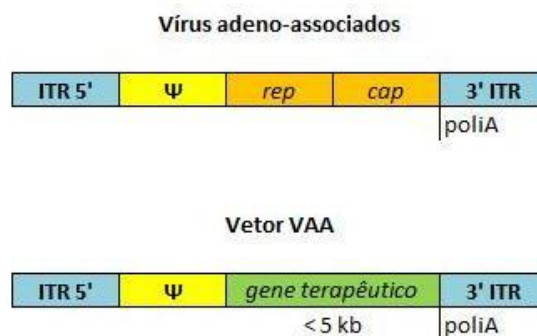
observando-se que quase 90% dos vetores adenovirais injetados *in vivo* são degradados nas primeiras 24 horas, muitas vezes antes de chegarem às células-alvo (Parks, 2000; Ritter, Lehmann, & Volk, 2002).

O uso dos adenovírus possui outras limitações que advêm da sua informação genética raramente se integrar no genoma da célula, permanecendo epissomal, ou seja, tem uma expressão transitória, não observável na prole das células transduzidas, resultando em perda de atividade terapêutica do gene, a longo prazo, em células em divisão. Também a baixa expressão de receptores celulares nas células-alvo específicos para adenovírus e a imunogenicidade elevada são as principais características desfavoráveis ao uso destes vírus como vetores (Puntel et al., 2013).

Vários estudos têm vindo a ser desenvolvidos para inibir a resposta inflamatória causada pelos adenovírus e proteger da degradação os viriões terapêuticos. No estudo da terapêutica gênica em oncologia foi salientada a importância da imunogenicidade característica dos adenovírus que, através da ligação a receptores específicos na membrana celular, poderá estimular o sistema imunitário a destruir as células tumorais (Osada, Morse, Hobeika, & Lysterly, 2012).

#### 5.1.4. Vírus adeno-associados

Os vírus adeno-associados (VAA) são pequenos vírus com cerca de 5kb, não envelopados e não patogênicos, pertencentes à família *Parvoviridae*, que infetam um largo espectro de células dos mamíferos (Gardlik et al., 2005).



**Figura 6.** Estrutura dos vírus adeno-associados (VAA) e vetores derivados.

São constituídos por uma molécula de ADN de cadeia simples com 4681pb e possuem nas porções terminais do genoma, sequências palindrómicas de 145pb denominadas de ITRs (*inverted terminal repeats*) que regulam o ciclo celular do VAA, sendo a origem e os iniciadores da replicação do ADN viral. Flanqueadas pelas ITRs encontram-se duas estruturas de leitura abertas (codão de iniciação e codão de terminação) que codificam a proteína regulatória, gene *rep*, e a proteína estrutural, gene *cap*. O gene *rep*, situado na porção 5', codifica quatro proteínas não-estruturais envolvidas na replicação do genoma viral. O gene *cap*, pertencente à porção 3', codifica três proteínas estruturais necessárias à formação da cápside viral, responsáveis pela proteção do vírus contra danos externos. A poliadenilina A (poliA), presente também na porção 3' estabiliza o mARN e aumenta a eficiência dos passos iniciais da translação (Figura 6) (Satoh, Hirai, Tamayose, & Shimada, 2000).

Os vetores adeno-associados provêm, na sua grande maioria, do serotipo VAA-2, podendo provir também dos serotipos VAA-1, VAA-3A, VAA-4, VAA-5 e VAA-6. Estes vetores foram desenvolvidos com o propósito de contornar os problemas que os vetores adenovirais e retrovirais possuem, como seja a incapacidade de integração do ADN no genoma da célula hospedeira, por parte dos adenovírus, que ocasionava uma expressão instável do gene terapêutico, e a integração aleatória do ADN, por parte dos retrovírus, resultando em mutagénese insercional ativadora de proto-oncogenes celulares humanos ou inibidora dos genes supressores de tumores. Dado que estes vírus são potencialmente patogénicos para o homem, as suas maiores desvantagens são as reações de índole inflamatória e imunológica que podem causar (Sen et al., 2013).

A principal propriedade específica dos VAA que motiva a sua utilização na terapia génica é o facto de estes apresentarem grande tropismo para uma elevada gama de linhagens celulares (*e.g.* células musculares, pulmonares, hepáticas e nervosas), não tendo contudo nenhuma doença humana associada. Os vírus adeno-associados podem ainda integrar-se em células em processo de divisão, ou pós-mitose, incluindo as diferenciadas, característica com grande valor terapêutico (Wright, Qu, Tang, & Sommer, 2003).

Um vetor adeno-associado é criado pela inserção do gene terapêutico entre os dois ITRs, deletando todos os genes responsáveis pela transfeção e replicação viral, semelhante ao método utilizado nos vetores adenovirais.

O VAA é considerado um vírus dependente, ou dependovírus, pois só é capaz de se replicar na célula em presença de um vírus auxiliar, geralmente adenovírus,



herpesvírus ou vírus *vaccinia*, que lhe forneça, por transcomplementação, os genes necessários à replicação e capsidação (Wright et al., 2003). O plasmídeo viral recombinante é co-transfetado para as PCLs HEK 293 juntamente com um vírus/plasmídeo auxiliar. Os vírus auxiliares contêm os genes deletados do vetor com o gene terapêutico, nomeadamente os genes VAA *rep*, VAA *cap*, os genes adenovirais E2 e E4 e outras sequências gênicas que possibilitam a correta expressão dos genes adeno-associados, e não contêm as regiões ITRs (Mueller, Ratner, Zhong, Esteves-Sena, & Gao, 2012).

Os vetores VAA contêm apenas 145bp, correspondentes aos ITRs, do seu genoma original, sendo a sua capacidade de empacotamento de ADN 5kb, o que, comparativamente aos outros sistemas virais, é bastante pequena. Para o empacotamento dos vetores e formação dos viriões são então necessárias células eucarióticas em cultura, proteínas responsáveis pela replicação do genoma viral e síntese da cápside, o ADN do vetor e o vírus auxiliar (Sen et al., 2013)

No final do processo os viriões são recuperados das células lisadas e o vírus auxiliar é removido em gradiente de CsCl ou por cromatografia. Para eliminação do vírus auxiliar, geralmente imunogénico, pode proceder-se ao congelamento seguido de aquecimento a 80°C de modo a só restarem os viriões terapêuticos, sem propriedades replicativas (Ayuso, Mingozzi, & Bosch, 2010).

À semelhança do que acontece com a forma original do vírus, que causa infeções latentes nas células humanas, os vetores VAA podem assegurar uma expressão do gene terapêutico a longo prazo, constituindo um grande ganho terapêutico. Aliado a isto também é observável uma grande estabilidade, segurança e eficácia por parte destes sistemas vetoriais. É de salientar que estes sistemas virais são derivados de vírus humanos, tendo grande tropismo para as nossas células, e não são patogénicos, daí não serem responsáveis por enfermidades (Giacca & Zacchigna, 2012).

A especificidade deste tipo de vetores, tal como com os outros vetores virais, pode ser aumentada. Assim, conseguiu-se aumentar a especificidade para células hematopoiéticas com o uso de um outro parvovírus, que dá origem ao vetor VAA B19, em que o genoma VAA é encapsulado numa estrutura capsular B19. Esta cápside reconhece os recetores específicos das células-alvo sem causar resposta inflamatória, pois não possui quaisquer genes virulentos. Estes vetores, com especificidade aumentada, podem ser usados no tratamento das hemaglobinopatias humanas (Grant, Yin, Zaytoun, Waseem, & Hobbs, 2009; Sen et al., 2013).

As desvantagens de utilizar VAA como vetores de transferência gênica residem no tamanho do seu genoma que limita a clonagem de determinados genes, pois acima de 5kb ocorre interferência no encapsulamento viral. Esta dificuldade foi parcialmente resolvida com a introdução dos vetores em células eucariotas com a técnica de lipotransfecção, sem prejuízo do amplo espectro de infecciosidade celular característico do VAA. A dificuldade de produzir estes vetores em larga escala também constitui uma desvantagem apesar de ter sido minimizada pela utilização de plasmídeos contendo sequências de ITR e sua multiplicação em linhagens recombinantes de *Escherichia coli* (Dani, 2000).

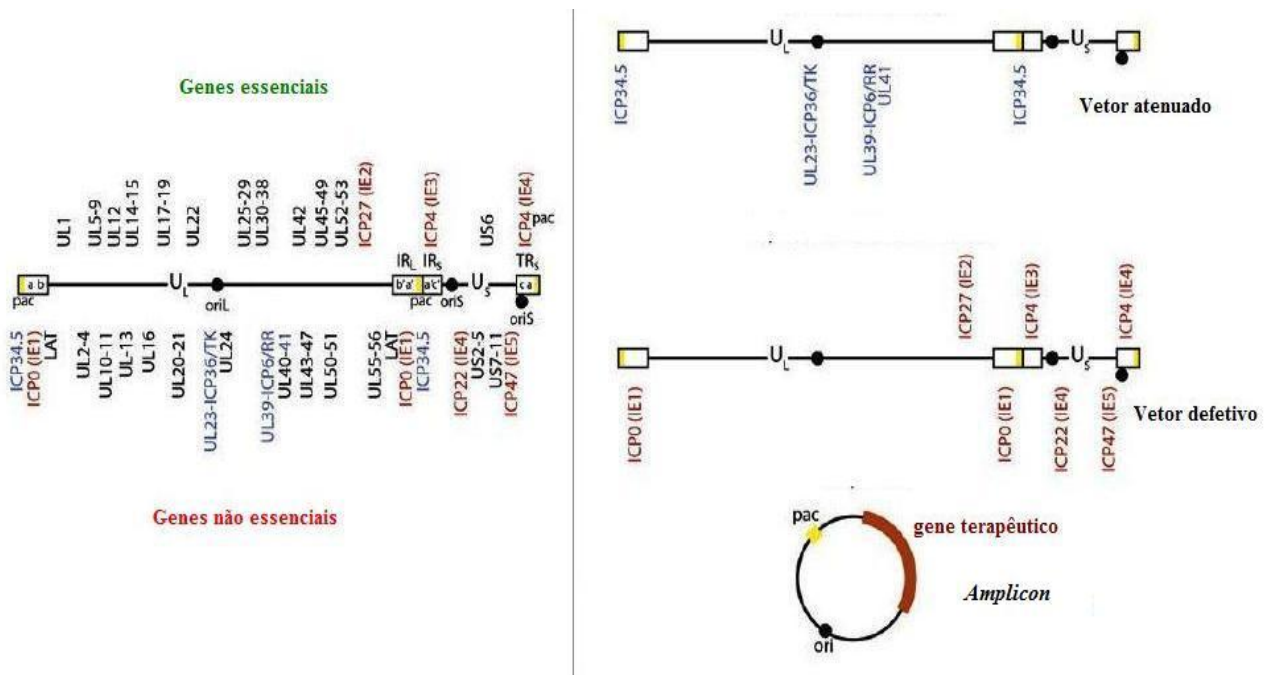
O uso de vetores VAA para ser vantajoso no tratamento da fibrose quística (Martini, Rocco, & Morales, 2011) e da hemofilia A (Couto, 2004; C. Li et al., 2012).

### 5.1.5. Vírus Herpes-Simplex tipo 1

O vírus herpes-simplex tipo 1 (VHS-1) ganhou interesse como vetor terapêutico devido à sua grande amplitude de infecção e infecciosidade natural de células em divisão e pós-mitóticas, podendo ainda estabelecer uma infecção latente nos neurónios. Contudo, uma vez que ainda não se conhece completamente as propriedades moleculares de algumas proteínas virais, devido à elevada complexidade do genoma destes vírus, a sua aplicação clínica é ainda bastante controlada (Neve, 2012).

O vetores provenientes de VHS-1 podem ser classificados em três tipos, consoante as suas características: vetores atenuados, vetores com replicação defetiva, e vetores de *amplicons* (**Erro! A origem da referência não foi encontrada.**) (Marconi, anservigi, & Epstein, 2010).

Os vetores atenuados, apesar de serem capazes de se replicarem, apresentam uma virulência atenuada comparativamente ao vírus original, devido à remoção de certos genes infecciosos desnecessários à replicação *in vitro* mas essenciais à replicação *in vivo* como a timidina quinase (ICP36/UL23), de uma porção da ribonucleótido redutase (ICP6/UL39), que bloqueia a translação do mRNA nas células infetadas, e do fator de neurovirulência ICP34.5 (Argnani, Lufino, Manservigi, & Manservigi, 2005).



**Figura 7.** Estrutura do vírus herpes-simples tipo I e vetores derivados: atenuado, defetivo e *amplicons*.

Adaptado de Giacca *et al.* (2012)

Estudos mostram que este tipo de vetores tanto se replicam quando inoculados no cérebro, como também se difundem para áreas mais afastadas. A administração dos vetores atenuados é feita na terapêutica do cancro, tanto em monoterapia como em associação com quimioterapia (T. C. Liu & Kirn, 2008). A terapêutica oncológica baseia-se em alguns genes que estes vetores possuem para aumentar a imunogenicidade das células tumorais, nomeadamente os genes codificadores das citocinas IL-4, IL-12, IL-10 e GM-CSF (Fukuhara & Homma, 2011; H. Li & Zhang, 2010).

Os vetores defetivos são vetores modificados que não conseguem replicar-se, por deleção de genes essenciais como o gene codificador do ICP4, apresentando por isso baixa patogenicidade em células cerebrais. Consoante se deleta mais genes virulentos, prolonga-se a sua capacidade de persistência *in vivo* e possibilita-se a introdução de mais genes exógenos no genoma viral, aumentando o seu valor terapêutico (Burton, Fink, & Glorioso, 2005).

Os vetores de *amplicons* (produtos de amplificação) são partículas virais idênticas à forma selvagem dos viriões VHS-1. O seu genoma consiste, para além da

sequência genética de interesse, em cópias concatameras de *amplicons* com o gene iniciador da replicação (*ori-S*) e o sinal de empacotamento (*pac*) derivadas do genoma do VHS-1 (Laimbacher & Fraefel, 2012).

Dado que os viriões VHS-1 podem empacotar moléculas de ADN com 150kb, os *amplicons* herpesvirais atualmente são os sistemas vetoriais que possibilitam maior capacidade de inserção génica. A sua produção é baseada na co-transfecção do *amplicon* com vários plasmídeos constituídos pelas proteínas virais necessárias à expressão viral ou na co-transfecção com um cromossoma bacteriano artificial (*bacterial artificial chromosome*, BAC) transportador das sequências proteicas virais requeridas para a produção de partículas virais (Giacca & Zacchigna, 2012).

Os sistemas vetoriais abordados acima estão a ser usados para expressar vários genes em ensaios pré-clínicos na terapêutica de doenças neurodegenerativas e dos tecidos muscular, cardíaco e hepático. Também estão a ser testados como vacinas genéticas (Laimbacher & Fraefel, 2012).

#### **5.1.6. *Poxvírus e Alphavírus***

Os *Poxvírus* são um grupo heterogéneo de vírus de ADN, derivados do vírus *vacinia*, da família *Poxviridae*, aos quais é introduzido o gene terapêutico sem quaisquer deleções ou inativações do genoma original. O facto de nenhum gene ser inativado, aliado à sua grande capacidade de se replicar, pode despoletar uma elevada resposta imunológica. Essa reação imunológica contra o vetor e célula infetada constituem características promissoras para o tratamento do cancro e doenças infecciosas (*e.g.* VIH) (Moroziewicz & Kaufman, 2005).

Tendo este vetor a sua capacidade replicativa ativa, apresenta vantagens, comparativamente aos outros tipos de vetores, no tratamento do cancro, criando um aumento bastante significativo da percentagem de células tumorais que expressam o gene terapêutico ao longo do tempo. Dadas as suas características únicas de replicação e especificidade, os investigadores têm estudado estes vetores visando a veiculação de antígenos tumorais e citoquinas moduladoras da resposta imunológica antitumoral. A especificidade tumoral pode ser aumentada com a seleção de diferentes mutações do vírus original (Burshtyn, 2013).

Têm vindo a ser testados *poxvírus* oncolíticos (e.g. JX-594) que expressam os transgenes GM-CSF e lac-Z. Estes vírus, após se replicarem, lisam as células cancerígenas e, conseqüentemente, estimulam a imunidade antitumoral, apresentando grande seletividade para tumores sólidos e um largo espectro de atividade (Parato et al., 2012).

Trabalhos mais recentes têm mostrado uma enorme expectativa no uso dos vetores baseados em *poxvirus* como vacinas contra o VIH, tendo mostrado resultados satisfatórios na fase III dos ensaios clínicos (Pantaleo, Esteban, Jacobs, & Tartaglia, 2010).

Os *alphavírus* são vírus envelopados, com uma cadeia simples de ARN e conformação icosaédrica pertencentes à família *Togaviridae*. Os vetores provenientes desta família são derivados dos vírus *Semliki Forest*, *Sindbis* e vírus da encefalite equina venezuelana, e têm usos quer terapêuticos quer profiláticos, multiplicando-se e expressando-se no citoplasma da maioria das células dos vertebrados. A sua capacidade profilática advém de um mecanismo que estimula eficazmente a produção do interferão tipo 1 (IFN-1), que induz um estado de resistência em células teciduais não infectadas, com especial interesse em vírus patogênicos, bactérias e tumores (Atkins, Fleeton, & Sheahan, 2008). Contrariamente aos *poxvírus*, a maioria destes vírus são incompetentes no que se refere à replicação. Os vetores *alphavírus* apenas codificam genes não estruturais, enquanto os genes estruturais, necessários à replicação, estão inseridos no genoma de um plasmídeo auxiliar. Para reduzir a possibilidade de formação de partículas infecciosas de replicação competente procede-se à divisão dos genes estruturais em dois plasmídeos auxiliares diferentes (Rayner, Dryga, & Kamrud, 2002).

Em 2010 chegaram a ser patenteados mutantes de *alphavírus* que asseguravam a expressão dos genes-terapêuticos por longos períodos de tempo. Foram também desenvolvidas e patenteadas novas estratégias de empacotamento de vetores, otimização da produção, aumento da capacidade de empacotamento e da especificidade desses vetores. Estas melhorias levaram a um aumento da segurança no uso dos *alphavírus* e incrementou o controlo e o rendimento da produção destes vetores, com diminuição dos custos inerentes (Aranda et al., 2011).

Analogamente a outros sistemas vetoriais, a capacidade replicativa das partículas virais pode ser vantajosa quando o alvo terapêutico é o tecido tumoral. Podem construir-se vetores com replicação competente, com todos os genes da forma selvagem do vírus juntamente com o gene terapêutico, visando a transdução do gene de interesse em

células tumorais e células adjacentes (Lundstrom, 2002). Foi demonstrado que a injeção intratumoral de *alphavírus* recombinantes induz a apoptose das células tumorais devido à sua imunogenicidade e capacidade de induzir respostas citotóxicas das células T (Rayner et al., 2002).

As principais aplicações dos vetores *alphavirus* são então a construção de vacinas, o tratamento de patologias do sistema nervoso central e a terapêutica anticancerígena (Atkins et al., 2008), como já mencionado.

## 5.2. Vetores não-virais

A transferência baseada na veiculação de genes com vetores não virais constitui uma alternativa simples e segura ao uso de vetores virais. O interesse surgiu devido à facilidade da sua produção e administração, com baixa imunogenicidade para as células hospedeiras, podendo recorrer-se a administrações repetidas com relativa segurança (Lundstrom & Boulikas, 2003). A dimensão do transgene a utilizar neste tipo de vetores é praticamente ilimitada, contrariamente ao que acontece com os vetores virais, representando uma enorme vantagem quando o gene de interesse, ou transgene, é de grandes dimensões (Gardlik et al., 2005).

Os vetores não-virais são constituídos por uma molécula de ADN circular, construído com base em técnicas do ADN recombinante, que integra o gene terapêutico de interesse e sequências promotoras e indutoras, que controlam a expressão desse gene (Xu, Shen, Chen, & Cen, 2005). A expressão do ADN e transgene é regulada pelos sistemas de transcrição e transdução da própria célula hospedeira, como discutido no capítulo 5.2.4 (Schatzlein, 2001).

A transfeção, geralmente *in vitro*, do ADN exógeno para as células alvo (*e.g.* células somáticas) pode ser obtida com a formação de complexos lipídicos, proteicos ou lipoproteicos, que aumentam a capacidade deste sofrer endocitose e ser transportado até ao núcleo, onde é expresso (Shimamura & Morishita, 2011).

Da observação de que o ADN veiculado através de sistemas não-virais tinha maior eficácia *in vitro* que *in vivo*, dada a maior complexidade dos sistemas biológicos, surgiu a necessidade de desenvolver novas técnicas para aumentar a eficácia de transfeção e o nível de expressão do transgene nos tecidos-alvo (Gardlik et al., 2005).

A eletroporação foi uma das técnicas testadas e que consiste na aplicação de impulsos elétricos fracos na membrana celular que, ao induzir o potencial de membrana, forma temporariamente poros membranares. Esta técnica é usada concomitantemente com a injeção de ADN, estando os elétrodos situados *in situ* de modo a facilitar a entrada dos fragmentos de ADN nos tecidos-alvo. A eletroporação teve efeitos positivos quando usada em células musculares, nervosas, hepáticas, epidérmicas e tumorais; diferenciando apenas os tempos e intensidades dos impulsos elétricos aplicados a cada tecido-alvo e a quantidade de ADN veiculado necessário para se observar efeito terapêutico. *In vivo*, a intensidade dos impulsos oscila entre as dezenas e as centenas de quilovolts e a duração de milissegundos (Tupin et al., 2003)

Outra técnica desenvolvida foi a *gene-gun*, que não necessita de qualquer sistema de veiculação complementar que possa causar alguma toxicidade ou resposta imunológica. Nesta técnica, o ADN é encapsulado em pequenas partículas de ouro ou tungstênio, as quais são disparadas contra as células-alvo a grande velocidade e pressão com o auxílio de hélio comprimido. Este tipo de veiculação gênica pode alcançar inúmeras células dispersas com apenas um disparo, e um único disparo pode veicular inúmeras variedades de marcadores e genes para diversas células-alvo. A técnica surgiu para transferência de genes de interesse em células vegetais, sendo hoje em dia também utilizado em células animais (Morgan & Kerschensteiner, 2011).

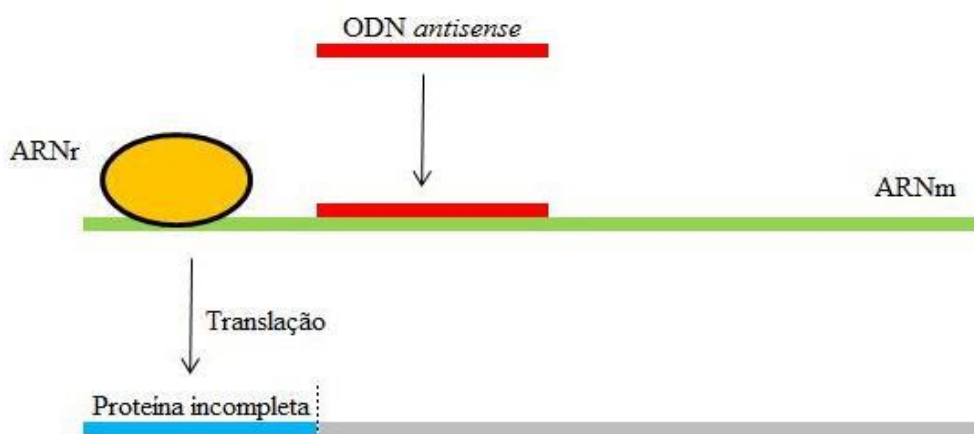
Comparativamente aos vetores virais, as técnicas, os métodos e o uso dos vetores não-virais representam maior segurança, mas ainda assim é necessário um maior incremento deste patamar de segurança.

### 5.2.1. Oligodeoxinucleótidos

Os oligodeoxinucleótidos (ODNs) foram os primeiros compostos sintéticos utilizados em terapia gênica como meio de inativação *in vivo* de genes responsáveis pelos mecanismos da doença, através da inibição da sua expressão (Calabretta, Skorski, Szczylik, & Zon, 1993).

A estratégia *antisense* e a estratégia com base em antígenos *decoy* são as duas abordagens usadas com ODNs. A primeira estratégia é baseada na inativação da transcrição do gene-alvo com o uso de ODNs *antisense* específicos desse gene, não

inativando a transcrição de quaisquer outros genes. A estratégia *antisense* resulta na supressão da expressão por ODNs complementares aos genes relacionados com as doenças através de efeitos a nível da transcrição e translação (Figura 8) (Kairemo, Tenhunen, & Jekunen, 1998).

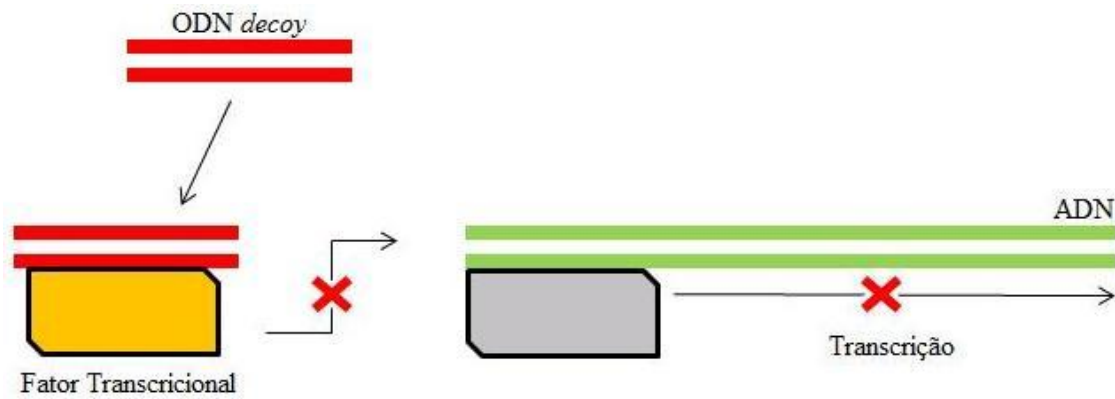


**Figura 8.** Estratégia ODN *antisense* na supressão da translação do ARNm

O uso de ribozimas é uma alternativa a esta primeira abordagem e consiste na utilização de moléculas de ARN específicas com atividade catalítica que interrompe o processo de translação através da clivagem de determinadas sequências de ARNm (Gardlik et al., 2005).

A estratégia com base em antígenos *decoy* consiste na modificação da regulação transcricional e uso de ODN de cadeia dupla, com elementos na conformação *cis*, como armadilha (*decoy*) para fatores transcricionais (FT) específicos. A função destes FT seria ativar a transcrição de genes específicos, contudo, ao estarem ligados aos ODN, a interação entre os FT e esses genes não é permitida, parando assim o processo de transcrição e consequentemente a expressão do gene-alvo (Figura 9) (Morishita, Aoki, & Kaneda, 2001).





**Figura 9.** Estratégia ODN *decoy* na supressão da transcrição de genes

O objetivo desta abordagem terapêutica é prevenir que os FT interajam com os genes-alvo e evitar a expressão de genes que codifiquem por exemplo proteínas de regulação do ciclo celular e citocinas. As vantagens desta abordagem são a simplicidade de síntese e manipulação que os ODN têm e a especificidade que possuem para os FT alvo, mas a alta taxa de degradação por endocitose e pelas nucleases, e o pequeno tempo de semivida, constituem algumas das suas limitações (Yokozeki, 2012). Os alvos desta terapêutica são as doenças relacionadas com fatores transcricionais como o E2F e NFkB, particularmente as do foro cardiovascular como a estenose, a hipertensão (angiotensina), inflamação e rejeição de transplantes (Morishita et al., 2001). Atualmente os ODN têm vindo a ser testados em aplicações no tratamento da pele de índole alérgica, nomeadamente no tratamento da dermatite atópica, tendo como alvo o gene STAT6 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 6*) através da estratégia *decoy*, interferindo na formação do edema e na desgranulação dos mastócitos. Este tratamento visa substituir a terapêutica tradicional com corticosteroides (Yokozeki, 2012).

A técnica do ARN de interferência, que valeu a Andrew Fire e Craig Mello o prémio Nobel da medicina, em 2006, constitui uma alternativa viável ao uso dos ODN *decoy*, por um mecanismo semelhante: uma dupla cadeia de ARN é introduzida nas células, esta reconhece e degrada o ARNm-alvo e impede a expressão de um gene específico (Mello & Conte, 2004). Os ARN de interferência são semelhantes a ODN de pequenas dimensões, 19-23 nucleótidos, e caracterizam-se por terem uma alta especificidade para o gene-alvo, maior tempo de semivida e uma eficácia de redução da

expressão do gene em mais de 90% (Montgomery, 2004). Esta técnica tem especial interesse no tratamento de doenças neurodegenerativas (Gonzalez-Alegre, 2008), infecciosas e metabólicas e em terapêuticas anticancerígenas (Ambesajir, Kaushik, Kaushik, & Petros, 2012).

Qualquer abordagem terapêutica com oligodeoxinucleótidos tem como alvos terapêuticos os processos patológicos em que estejam presentes a inativação de genes específicos ou a inibição de uma função fisiológica indesejável causada pela dominância de alelos mutantes (Mello & Conte, 2004).

### **5.2.2. Lipoplexos**

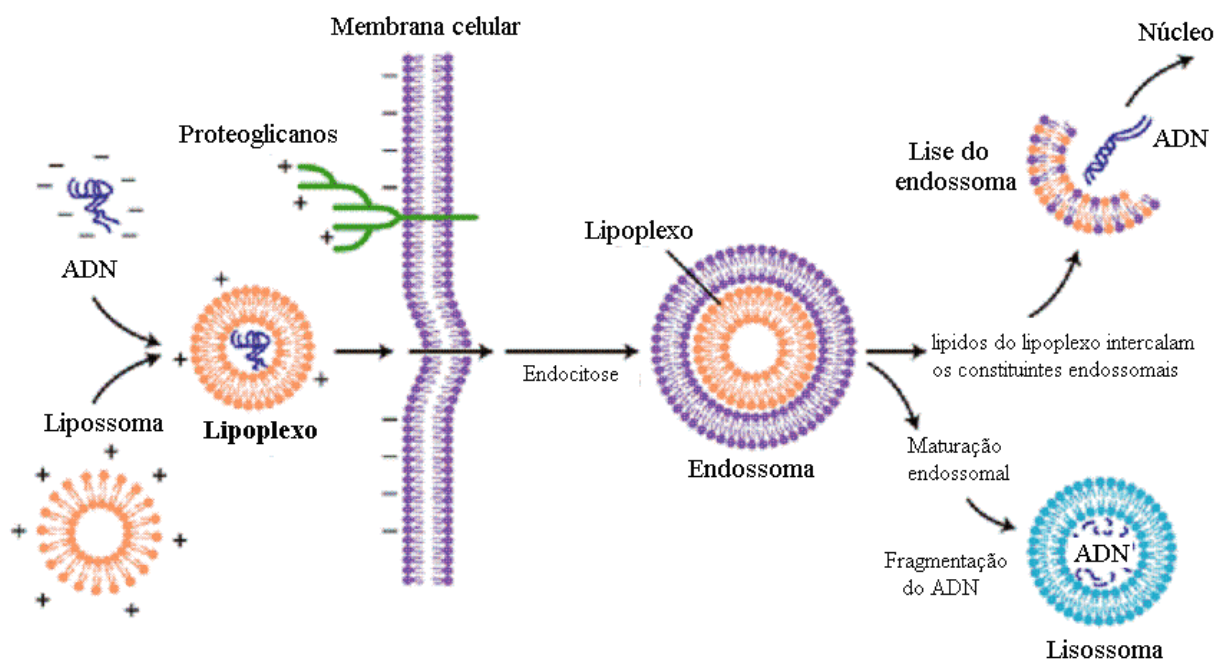
O ADN plasmideal pode ser ligado a uma estrutura organizada de lípidos, como é o caso das micelas e dos lipossomas, de modo a modificar as suas propriedades químicas e facilitar a sua entrada na célula. Este complexo formado entre o ADN e os lípidos é chamado de lipoplexo, sendo a interação entre estes dois constituintes dependente, quer da estrutura dos lípidos, quer das condições físicas (*e.g.* carga elétrica, pH). Os lipoplexos podem ser constituídos por lipossomas aniónicos, neutros ou catiónicos, diferindo nas suas propriedades e potencialidades (Tarahovsky, 2009).

Os lipossomas aniónicos e os neutros foram os primeiros a ser desenvolvidos para esta aplicação particular e tinham como principais características a sua segurança, a compatibilidade com os fluidos biológicos e a especificidade tecidual na transferência génica. Contudo, os custos de produção destes lipossomas são demasiado elevados e apresentam baixa expressão nas células *in vivo*, tendo a atenção sido desviada para os lipossomas catiónicos (Tros de Ilarduya, Sun, & Duzgunes, 2010).

Os lipossomas catiónicos são compostos por três domínios diferentes: uma cabeça carregada positivamente, uma cadeia alifática, e ligações entre as regiões polares e apolares (Parker, Newman, Briggs, Seymour, & Sheridan, 2003). Devido às suas cargas positivas, criam naturalmente complexos com o ADN (carregado negativamente), ao contrário do que acontece com os lipossomas aniónicos e neutros, que necessitam a inserção do ADN no interior do veículo. Esta carga positiva facilita também a sua ligação às cargas negativas da membrana citoplasmática e a posterior entrada no interior da célula através de uma interação com os proteoglicanos

membranares (Wasungu & Hoekstra, 2006). Após a endocitose na célula hospedeira, o lipoplexo é degradado dentro do endossoma e o ADN é libertado no citoplasma possibilitando o seu efeito terapêutico (Figura 10). Este processo é mediado pelos denominados lípidos auxiliares, frequentemente de carácter neutro, presentes na constituição do lipossoma, desempenhando este mecanismo de rutura um papel essencial para a transfeção ser bem-sucedida; caso contrário o ADN exógeno à célula seria degradado pelas enzimas endossomais. Três lípidos neutros são habitualmente utilizados na formulação dos lipossomas catiónicos: a dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), a dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) e o colesterol (Lv, Zhang, Wang, Cui, & Yan, 2006). A DOPE tem a função de facilitar a fusão do lipossoma com a membrana celular e a fragmentação do ADN no lisossoma. O lípido DOPC é usado como estabilizador da bicamada fosfolipídica, protegendo a informação genética a transportar. Estes constituintes baixam eficazmente a citotoxicidade inerente aos lipoplexos (Hafez, Maurer, & Cullis, 2001).

O complexo quaternário resultante: ADN/ lipossoma catiónico/ lípidos neutros (DOPE e DPOC), têm uma alta eficiência de transfeção e baixa citotoxicidade, grande proteção contra a ADNase I e baixa ligação com as proteínas séricas (Tokunaga, Hazemoto, & Yotsuyanagi, 2004).



**Figura 10.** Formação de lipoplexos e esquema de transfeção. Adaptado de Parker et al. (2003)

A facilidade do transporte para o núcleo depende do tamanho do ADN que se quer transfetar e da conformação que este ADN assume, sendo que a conformação linear é a que mais eficazmente passa a membrana nuclear. A entrada do ADN é feita através dos complexos de poros nucleares, presentes na membrana nuclear (Wasungu & Hoekstra, 2006).

Em comparação com os outros sistemas de veiculação, como os vetores virais, os lípidos catiónicos são simples e fáceis de formular, não são biologicamente perigosos e são fáceis de encontrar comercialmente e adaptar para aplicações específicas. A especificidade e a resistência dos lipoplexos são determinadas pela estrutura dos lipossomas utilizados, principalmente pela sua componente hidrofóbica. Pode ainda aumentar-se a especificidade da transfeção com a adição de ligandos específicos para determinados tecidos (Zhang et al., 2004).

Os efeitos citotóxicos estão associados à natureza catiónica dos vetores, principalmente devido à estrutura da região hidrofóbica. Os lipoplexos catiónicos podem tornar-se citotóxicos por interação com enzimas essenciais, como a proteína quinase C (PKC). Contudo, estudos mostraram que alguns derivados do colesterol que contêm grupos de azoto terciário ou quaternário podem inibir a capacidade da PKC, diminuindo a toxicidade do vetor *in vivo* (Bottega & Epand, 1992).

Uma solução para diminuir a toxicidade dos lipoplexos *in vivo* passa pela síntese de lípidos catiónicos com a conformação de anéis heterocíclicos lipídicos (Scarzello et al., 2005).

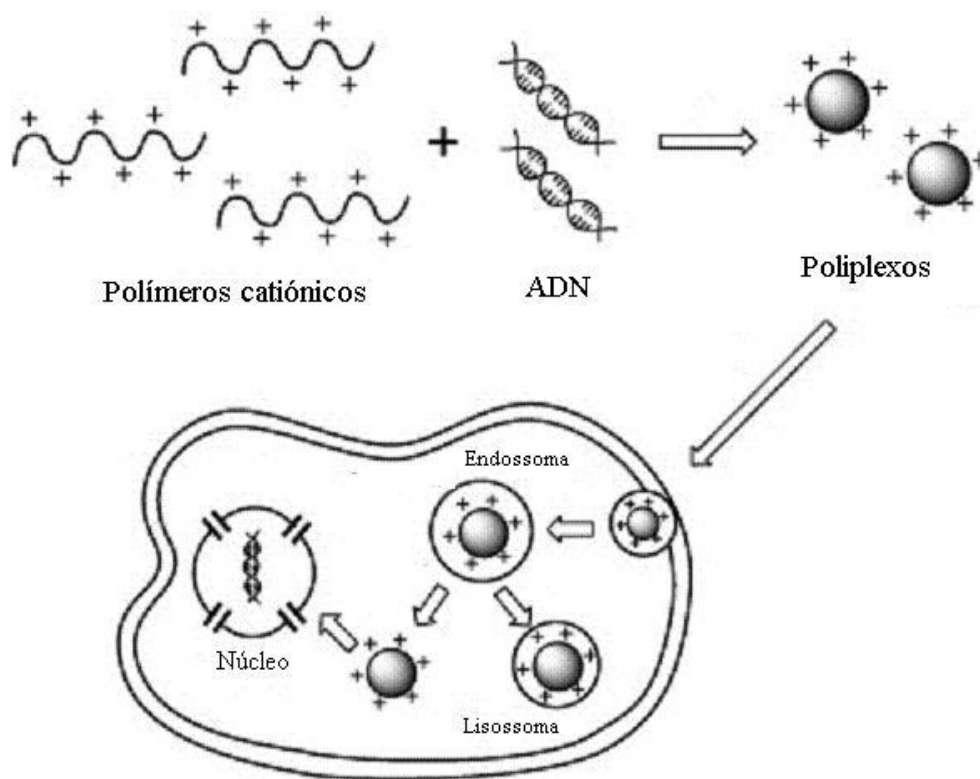
As proteínas séricas podem diminuir a eficiência de transfeção através da inibição do potencial zeta positivo (Mirska et al., 2005) e pela ligação aos lipoplexos, causando aumento do tamanho destes e, por esse motivo, diminuindo a sua internalização na célula (Friend, Papahadjopoulos, & Debs, 1996).

O uso mais frequente do complexo ADN-lipossoma é a transferência gênica para células cancerígenas, nas quais são estimulados processos imunológicos anticancerígenos, ou genes que diminuem a atividade dos oncogenes (Dass & Su, 2000). Foram também observados bons resultados na transferência de lipoplexos para células epiteliais do trato respiratório, possibilitando o tratamento de doenças respiratórias e da fibrose quística (Guillaume et al., 2001; Sanders, Van Rompaey, De Smedt, & Demeester, 2002).

### 5.2.3. Poliplexos

Estes vetores sintéticos, não-virais, denominados de poliplexos, têm como base um complexo entre o ADN e polímeros. Os poliplexos são maioritariamente constituídos por polímeros catiónicos, sendo a sua produção regulada por interações iônicas. Contrariamente ao que acontece com os lipoplexos, alguns destes complexos não libertam o ADN exógeno no citoplasma, sendo necessária a co-transfecção com agentes que lisem o endossoma formado aquando da endocitose (*e.g.* adenovírus inativado) (Tros de Ilarduya et al., 2010).

O tamanho do polímero determina a eficácia e a especificidade da transferência gênica. De salientar que, quanto mais longa é a cadeia polimérica utilizada, maior a condensação do ADN e, consequentemente, maior a proteção contra a degradação enzimática. Contudo para que se observe efeito terapêutico a molécula de ADN tem de se libertar do complexo, não se devendo utilizar cadeias poliméricas de dimensões muito grandes (Forrest & Pack, 2002).



**Figura 11.** Formação de poliplexos e esquema de transfecção. Adaptado de Lin & Engbersen (2008)

A diferença mais óbvia entre os polímeros catiónicos e os lipossomas catiónicos é que os primeiros não possuem a componente hidrofóbica e são totalmente solúveis em água. Comparativamente aos lipossomas conseguem comprimir as moléculas de ADN em tamanhos mais pequenos, o que constitui uma vantagem do ponto de vista da transferência de informação genética para a célula. A sua especificidade pode ser alterada através da variação da sua massa molecular, da geometria (linear ou ramificada) e da ligação de diferentes ligandos ou polietilenoglicol (Elouahabi & Ruyschaert, 2005). Os polímeros estudados mais aprofundadamente para o uso em terapia génica são a polietilenimina (PEI) e a poli-L-lisina (PLL) (Lin & Engbersen, 2008).

Os polímeros PEI possuem um mecanismo de lise endossomal, não sendo portanto necessária a co-transfeção com outros agentes. Assumem duas conformações diferentes: linear e ramificada, apresentando toxicidades e eficácias de transfeção diferentes. Estas características podem ser alteradas através da modificação das propriedades químicas dos compostos, tais como a massa molecular, o grau de ramificação, a força iónica da solução, o potencial zeta e o tamanho das partículas (Kunath et al., 2003). Estudos mostram que massas moleculares baixas (10 kDa) e cadeias moderadamente ramificadas apresentam grande eficácia de transfeção e baixa toxicidade para o organismo (D. Fischer, Bieber, Li, Elsasser, & Kissel, 1999). Estes polímeros são utilizados como vetores em terapia génica de inalação e, como não são invasivo, são muito utilizado como veículo em terapêuticas do trato respiratório com expressão permanente do gene veiculado no tecido-alvo, sem efeitos indesejáveis em tecidos adjacentes (Merlin, N'Doye, Bouriez, & Dolivet, 2002). O tamanho das partículas de aerossóis, à semelhança do que acontece em outras terapêuticas que não a terapia génica, vai determinar a especificidade e o local de ação: partículas maiores atuam no trato respiratório superior, partículas mais pequenas, têm maior atuação no trato respiratório inferior. Julga-se que a polietilenimina pode ser utilizada como veículo na transferência de genes apoptóticos para células pulmonares cancerígenas (Rudolph, Muller, & Rosenecker, 2002).

As PLL, os primeiros polímeros sintéticos usados em terapia génica, são polipéptidos lineares que têm como unidade estrutural o aminoácido lisina, propriedade bastante útil em aplicações *in vivo*. Contudo, no sistema circulatório estes políplexos ligam-se facilmente às proteínas plasmáticas e são rapidamente eliminados do

organismo, resultando numa baixa eficácia de transfeção (Ward, Read, & Seymour, 2001). Para uma transferência de informação gênica mais eficaz é necessário a co-transfeção deste poliplexo com um agente lisossomotrópico que reduza a degradação enzimática por parte do lisossoma; contudo o uso destes agentes aumenta a toxicidade do poliplexo (Funhoff et al., 2005).

Vários polímeros derivados da PLL foram testados, observando-se que para massas moleculares maiores, apesar da toxicidade, ocorre mais facilmente a transferência de informação gênica para a célula (Wolfert et al., 1999). Trabalhos de Okuda et al. (2004) mostram que o poliplexo KG6, uma PLL dendrítica de 6ª geração, apresenta grande eficiência de transfeção com baixa toxicidade orgânica (Okuda, Sugiyama, Niidome, & Aoyagi, 2004).

O uso de nanopartículas poliméricas ligadas a uma molécula de ADN, como o complexo gelatina-ADN e quitosano-ADN, constitui uma alternativa aos poliplexos. Embora não apresentem os níveis de transfeção dos lipoplexos e poliplexos, em comparação com as injeções de ADN têm uma maior expressão *in vivo* se forem administradas por injeção intramuscular ou intratecal (Mansouri et al., 2004).

#### **5.2.4. Regulação da expressão gênica em vetores não-virais**

A principal limitação de qualquer vetor não-viral é a dificuldade deste se manter estável e exprimir o gene terapêutico de forma duradoura. Estas limitações advêm de três problemas distintos: diluição gênica, condensação da cromatina e diacetilação das histonas, e ausência da enzima necessária à transcrição.

A razão para haver uma expressão gênica pouco duradoura é, em primeiro lugar, a sua inativação, causada por inúmeros processos, dos quais se destaca o fenómeno de diluição gênica. Este fenómeno acontece maioritariamente nas células-alvo em divisão, em que o plasmídeo vetorial não se encontra integrado, levando a que, em cada ciclo celular, a concentração do ADN exógeno diminua, chegando a níveis subterapêuticos (Glover, Lipps, & Jans, 2005).

Este problema pode ser resolvido com a utilização de replicões virais (*e.g.* VEB, SV40) juntamente com vetores não-virais. Algumas sequências destes vírus, como o gene EBNA1 do VEB juntamente com a sequência *oriP*, ligada ao cromossoma,

garantem a replicação extracromossomal do gene de interesse, a estabilidade do vetor e uma maior eficácia de transferência do material genético, facilitando a sua expressão em células em processo de divisão (Tu et al., 2000).

Outra das razões para a inativação da expressão é a existência de uma enzima que condensa a cromatina e diacetila as histonas chamada de complexo histona-diacetilase, mecanismo que, apesar de não ser completamente conhecido, se sabe que inibe qualquer leitura ou interação com o ADN endógeno. Sabe-se, contudo, que a reativação dos genes inativados pode ser conseguida com o uso de inibidores da histona-diacetilase (*e.g.* trichostatina A) (Bartoli et al., 2003).

O último passo limitante da expressão génica é o transporte do ADN exógeno para o núcleo de modo a que a ARN polimerase, presente exclusivamente no núcleo celular, proceda à transcrição da informação genética de interesse. O problema é que muitos plasmídeos de origem não-viral depois da entrada na célula através da membrana celular, mantêm-se no citoplasma, onde acabam por ser gradualmente degradados e inativados. Várias abordagens foram desenvolvidas como solução: uso dos genes EBNA1 e *oriP*, abordados anteriormente, ou do sistema de expressão T7, em que a enzima ARN polimerase T7 se liga ao promotor T7 presente no vetor e possibilita a transcrição do ADN-terapêutico fora do núcleo (Brisson, He, Li, Yang, & Huang, 1999).

Depois de ter em conta estes aspetos limitativos e as suas possíveis soluções, é necessário aumentar a especificidade dos vetores de modo a não expressarem o gene de interesse fora dos tecidos-alvo. A estratégia principal baseia-se na introdução de promotores específicos para os tecidos-alvo de modo a ativarem a cromatina inativada (condensada) e criar zonas de transcrição teciduais específicas. As LCR (*locus control region*) são um exemplo de promotores teciduais específicos, que têm o objetivo de promover a transcrição da informação génica pela ARN polimerase. Para além de veicularem o gene terapêutico, os vetores também possibilitam a regulação da expressão desse gene, através de um indutor. Este indutor é uma substância, administrada após o vetor ter sido transferido para o tecido alvo, que ativa o promotor e assegura a correta expressão dos genes transcritos (Gardlik et al., 2005).

Os indutores utilizados devem ser altamente específicos de modo a transcrever apenas o gene específico de cada promotor, e cada promotor por sua vez tem igualmente de ser específico de cada indutor. Para os sistemas indutores serem viáveis e seguros devem apresentar uma elevada reprodutibilidade e capacidade de reversão da sua



ativação. Substâncias como a tetraciclina e da rapamicina são exemplos de moléculas usadas na indução da atividade de certos genes (J. Wang, Voutetakis, Zheng, & Baum, 2004).

Os perigos a ter em conta com o uso destas substâncias são a toxicidade química que possam apresentar e a ocorrência de uma resposta imunitária forte. Problemas que podem ser ultrapassados com o uso de indutores derivados apenas de fatores transcricionais humanos (Gardlik et al., 2005).

### **5.3. Vetores híbridos**

Este tipo de vetores foi criado com a finalidade de complementar os sistemas vetoriais anteriormente desenvolvidos (discutidos nos capítulos 5.1 e 5.2), ou seja, englobar as vantagens dos sistemas virais e não virais num único sistema de vetores e, principalmente, superar as limitações que surgem com o uso isolado de qualquer um deles. (Schmidt-Wolf & Schmidt-Wolf, 2003).

Os vetores virais são os veículos mais utilizados na terapia gênica pois, comparados aos vetores não-virais, são mais evoluídos no que toca à entrega de informação genética nas células hospedeiras, característica natural do seu ciclo de vida. Apesar da sua eficiência de transdução, muitos ensaios clínicos e experiências laboratoriais mostraram que estes também apresentam limitações como seja a imunogenicidade, a genotoxicidade e a limitada capacidade de empacotamento.

Para ultrapassar os problemas de genotoxicidade e melhorar a expressão do transgene terapêutico, foi proposta a construção de vetores híbridos. O objetivo é, então, adicionar novas capacidades aos vetores e substituir elementos indesejáveis que constituam problemas, combinando as características individuais positivas e vantajosas de vários sistemas vetoriais (Huang & Kamihira, 2013).

Os virossomas são um exemplo de vetores híbridos produzidos a partir da fusão de lipoplexos com partículas virais. Um exemplo é a hibridação de lipoplexos com espículas do vírus hemaglutinante do Japão (VHJ) ou vírus influenza. Esta hibridação é utilizada na transferência de genes para o trato respiratório, residindo o seu potencial na sinergia da eficácia de transfeção dos lipossomas catiónicos com as espículas dos vetores virais. É também observável uma maior tolerabilidade do ponto de vista

imunológico com a administração repetida de injeções (Huckriede, Bungener, Daemen, & Wilschut, 2003).

Também já foi testado a hibridação de um vetor retroviral com lipossomas, associando partículas específicas do vírus da leucemia murina com lipossomas sintéticos carregando agentes de transfeção, como o DOPE e o colesterol. O objetivo é substituir o envelope proteico viral, que está na origem da imunogenicidade e da baixa estabilidade (Keswani, Pozdol, & Pack, 2013).

Uma hibridação que também mostrou resultados positivos foi a reunião, num único vetor, de compostos poliméricos e lipídicos, que são solúveis em água e que não apresentam toxicidade para uma grande variedade de células: o lipopolímero PEI-colesterol. Este tem características anfotéricas graças à hidrofilia dos polímeros PEI e à hidrofobia do colesterol (D. A. Wang et al., 2002).

Os polímeros ou lipossomas catiónicos hibridados com um vetor adenoviral, constituem outro grupo de vetores híbridos, sendo de especial interesse na transferência de genes para células que não possuem quaisquer recetores virais. Foi mostrado que a ligação de adenovírus inativados a polímeros ou lipossomas catiónicos aumenta a eficiência da transfeção destes últimos (Lam & Breakefield, 2000). Disto são exemplo os trabalhos que hibridam um vírus da leucemia murina com polímeros que facilitam a entrada do vírus na célula e promovem a sua libertação no endossoma (Drake, Keswani, & Pack, 2010).

Os híbridos vírus-vírus são uma combinação de vários tipos de vetores virais, constituindo um sistema vetorial que apresenta as características mais vantajosas de cada um dos vírus originais. Um exemplo desta hibridação é a fusão do adenovírus com o vírus de *Epstein-Barr* (VEB), apresentando os altos títulos dos adenovírus e a expressão a longo prazo do VEB (Tan, Wu, & Berk, 1999).

Uma abordagem que também tem sido testada é a hibridação de VAA de serotipos diferentes, visando criar um vetor com as qualidades de cada um deles, através do uso de genes codificadores das proteínas da cápside, alterando a especificidade destes para um tecido-alvo em particular (Choi, McCarty, & Samulski, 2005). Na veiculação de genes para o tecido muscular foram testadas hibridações com os genes *rep* e *ITR* do VAA-2 e o gene *cap* do VAA-5, com observação de maior eficiência na transfeção (Hildinger et al., 2001).

Outro sistema vetorial testado foi a hibridação de um vetor adeno-associado com um vetor baseado no vírus herpes-*simplex* tipo 1, que associa a capacidade de

empacotamento e alta eficácia de infeção de células mitóticas e pós-mitóticas do VHS-1 com a especificidade de integração e a longa duração de expressão do transgene inerente ao VAA (Saydam, Glauser, & Fraefel, 2012).

Com a evolução do conhecimento científico e desenvolvimento de novas técnicas e métodos de manipulação biotecnológica, cada vez se tem vindo a observar mais hibridações entre os sistemas vetoriais anteriormente utilizados individualmente.

## 6. Panorama atual da terapia gênica

Tal como abordado ao longo do trabalho, uma elevada gama de vetores tem vindo a ser desenvolvidos, exibindo características específicas que lhes conferem diferentes vantagens e desvantagens, e resultando em diferentes alvos e potenciais terapêuticos.

Ao longo do tempo, certos vetores têm vindo a perder interesse por se terem observado riscos inerentes à saúde, ou não terem demonstrado quaisquer vantagens terapêuticas, enquanto outros têm crescido e ganho interesse na sua aplicação clínica com a descoberta de novos potenciais de utilização.

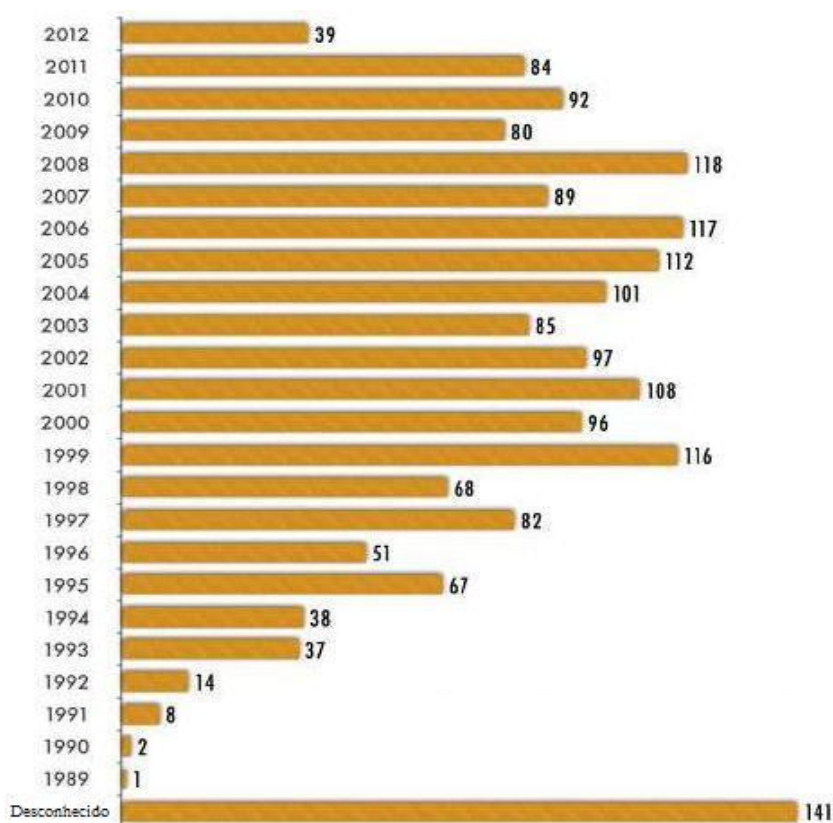
Este capítulo tem então o objetivo de abordar a evolução dos ensaios clínicos que têm vindo a ser desenvolvidos, a nível mundial, ao longo das últimas décadas, dando ênfase aos vetores génicos mais utilizados e aos alvos terapêuticos mais habitualmente testados.

Os dados apresentados neste capítulo são de resultados provenientes de várias entidades reguladoras de diferentes países, literatura publicada, apresentações em conferências e dados cedidos por investidores e investigadores da área da genética, compilados no *The Journal of Gene Medicine*, publicado no início de 2013 (Ginn, Alexander, Edelstein, Abedi, & Wixon, 2013). Estes dados são apenas representativos dada a dificuldade de identificação de todas as bases de dados. Para além disso, alguns centros de investigação limitam o acesso aos seus dados e, em certos países, dada a falta de uma entidade reguladora é difícil estimar quais os ensaios clínicos em curso. Ginn e os seus colaboradores compilaram, quanto possível, artigos publicados na área dos ensaios clínicos com terapia génica tendo por base o uso de palavras-chave, selecionadas por estes, em motores de busca como o *Pubmed* e o *Science Direct*. Outro problema na recolha de dados foi a existência de muitos artigos que não foram traduzidos para a linguagem ocidental, nomeadamente de origem chinesa e japonesa.

Contudo, a existência destas lacunas, não impossibilita de todo a análise dos trabalhos que se desenvolveram e desenvolvem nesta área, a sua tendência evolutiva e os usos clínicos.

## 6.1. Ensaios clínicos desenvolvidos

Ao longo dos últimos anos tem-se observado um aumento do número de ensaios clínicos usando tratamentos génicos, observando-se um maior salto no crescimento no início da década de 1990 e no início do ano 2000 (Figura 12). Por seu turno, são notadas diminuições em anos que se seguem àqueles em que foram reportados efeitos adversos graves com o uso desta terapêutica, como em 2003 e 2007, como discutido mais à frente. O número reduzido de ensaios reportados nos anos de 2011 e 2012, deve-se a que não houve tempo para a publicação dos resultados e também à dificuldade que os investigadores tiveram em obter informação acerca de trabalhos publicados recentemente.



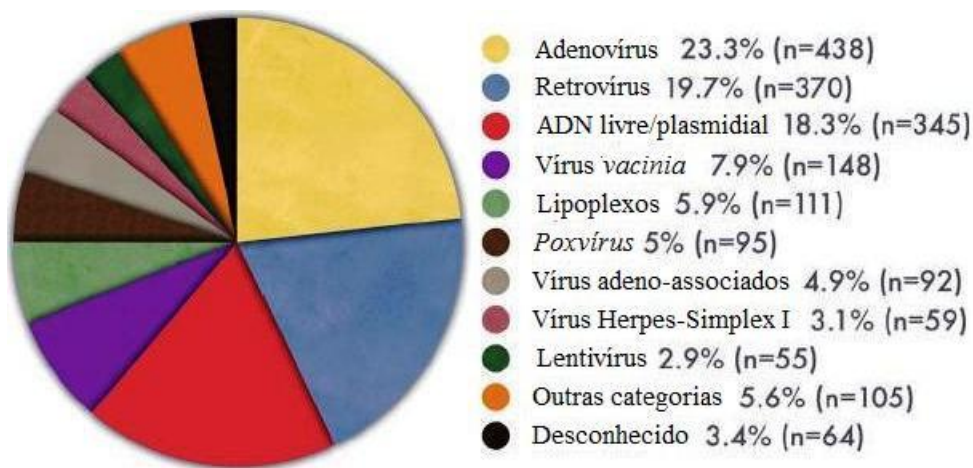
**Figura 12.** Número de ensaios clínicos usando terapia génica aprovados mundialmente. Adaptado de Ginn *et al.* (2012)

Ao aumento dos ensaios clínicos aprovados, seguiu-se o crescimento do número de ensaios que passaram as fases I e I/II, constituindo estes ainda 78.6% do total de ensaios clínicos em curso. Foi o avanço do conhecimento científico ao longo dos

últimos anos que incrementou a proporção dos ensaios clínicos nas fases II, II/III e III, aumentando de 15% (dados de 2004) para 19.1% (2007), constituindo em 2012 cerca de 21.2% de todos os ensaios clínicos em curso. Ensaios na última fase clínica, fase IV, correspondem ainda a um número bastante pequeno, 0.1%, devido a problemas de segurança e especificidade dos vetores utilizados, observados nas fases clínicas precedentes.

## 6.2. Vetores utilizados

Um grande leque de vetores tem vindo a ser aplicado em ensaios clínicos de terapia gênica e a criação de vetores não-virais alternativos veio aumentar ainda mais as possibilidades terapêuticas desta abordagem (Figura 13). Contudo são os vetores virais que mais normalmente são utilizados em ensaios clínicos, correspondendo a 2/3 do total de ensaios aprovados.



**Figura 13.** Vetores utilizados em ensaios clínicos de terapia gênica. Adaptado de Ginn *et al.* (2012)

Ao longo dos anos, o retrovírus, inicialmente o vírus mais utilizado como vetor, tem vindo a perder importância devido aos efeitos adversos graves observados nos doentes com SCID, baixando de 28% (em 2004), para 22.8% (2008) e situando-se agora em valores que rondam os 19.7%.

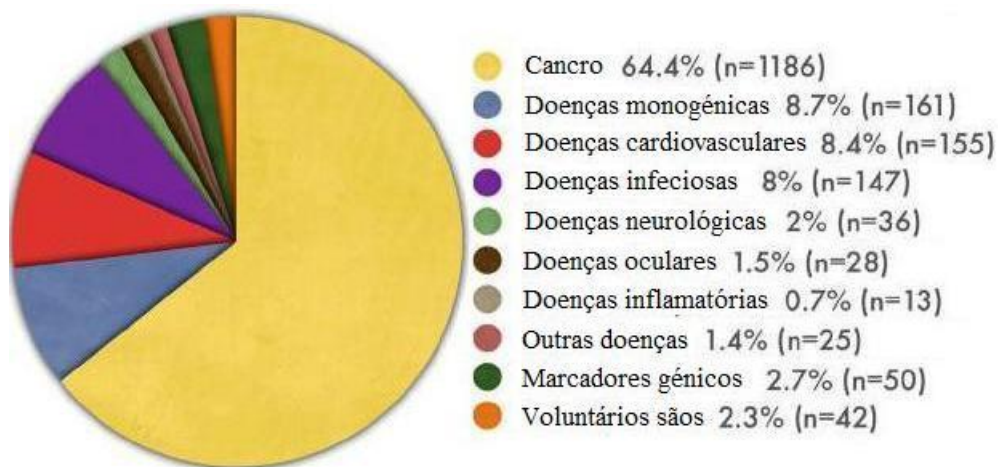
O vetor que tem ganho importância é o baseado em adenovírus, com 23.3% do total de ensaios clínicos em curso, devido à sua maior capacidade de empacotar moléculas de ADN, comparativamente ao retrovírus, elevada expressão génica e infeção de células que não estão em estágio de divisão.

Vírus como os adeno-associados, o *vacinia*, o *poxvirus* e o VHS-1 têm vindo a ser cada vez mais testados, mostrando serem uma potencial alternativa aos vetores retrovirais.

A popularidade do ADN livre e do ADN plasmideal tem também vindo a aumentar devido à sua simplicidade, facilidade de construção e nível de expressão génica que produzem. Nos últimos oito anos, a sua utilização em ensaios clínicos aumentou de 15% para 18.3%.

### 6.3. Indicações terapêuticas

O uso dos diferentes vetores, virais ou não-virais, engloba uma grande gama de alvos-terapêuticos, sendo as áreas das doenças monogénicas, doenças cardiovasculares e cancro as que têm apresentado mais sucesso terapêutico; daí constituírem juntas 81.5% do total das aplicações clínicas da terapia génica (Figura 14).



**Figura 14.** Indicações terapêuticas da terapia génica. Adaptado de Ginn et al. (2012)

### 6.3.1. Cancro

Na terapêutica do cancro, correspondente a 64.4% do total dos ensaios clínicos, as estratégias aplicadas são a inserção de genes supressores de tumores, genes imunoterapêuticos e genes para ativação de pro-fármacos usados em quimioterapia. As abordagens terapêuticas desenvolvidas são por exemplo: vacinação com células tumorais manipuladas, estimuladoras do sistema imunitário; vacinação com vetores virais que codificam antigénios tumorais; vacinas de ADN; e injeções intratumorais de vetores que codificam citoquinas (Ginn et al., 2013).

A Tabela 2 resume os vários tipos de cancro em que a terapia gênica está a ser testada.

**Tabela 2.** Potencialidades da terapia gênica no tratamento do cancro

<b>Tipos de Cancro</b>	<b>Exemplos</b>
Ginecológico	Mama, ovário, vulva, colo do útero
Sistema nervoso	Glioblastoma, glioma, neuroblastoma, retinoblastoma
Gastrointestinal	Colon, pâncreas, metástases hepáticas, vesícula biliar
Genitourinário	Próstata, rim, bexiga, neoplasia anogenital
Pele	Melanoma maligno, melanoma metastático
Cabeça e pescoço	Carcinoma nasofaríngeo, carcinoma esofágico
Hematológico	Leucemia, linfoma, mieloma múltiplo
Outros	Pulmões, tiróide, sarcoma, células germinativas

Os vírus oncolíticos são uma categoria especial na terapêutica do cancro, sendo cada vez mais utilizados em ensaios clínicos devido à sua capacidade de se replicarem especificamente no tecido tumoral causando, consequentemente, a lise da célula infetada e destruição do tumor. Estes vírus podem estimular o sistema imunitário de modo a aumentar o seu efeito terapêutico (Liu et al., 2012). O VHS-1 tem vindo a ser



testado quanto às suas propriedades oncolíticas nas células cancerígenas mamárias (J. Wang, Hu, Zeng, Rabkin, & Liu, 2012) e nas células tumorais cerebrais (G. Takahashi, Meshii, Hamada, Iwai, & Yura, 2013). Também o vírus *vaccinia* atenuado provou ter interesse terapêutico quando usado no tratamento do cancro da tireoide (Gholami et al., 2011) ou, quando concomitantemente usado com radioterapia, em vários tratamentos de cânceres da cabeça e pescoço (Mansfield et al., 2013)

Alguns genes, habitualmente chamados de genes-suicida, podem ser utilizados para a ativação *in situ* de pro-fármacos quimioterapêuticos, atuando apenas no interior da célula tumoral e no meio envolvente, o que constituiu uma nova abordagem terapêutica que aumenta a eficácia da quimioterapia, e diminui os efeitos adversos inerentes (Niu, Du, Xu, Zhang, & Wang, 2012).

### 6.3.2. Doenças cardiovasculares

No campo das doenças cardiovasculares (8,4% do total das aplicações da terapia gênica), o interesse do uso da terapia gênica é utilizar genes que estimulem a angiogênese, protejam o miocárdio e regenerem e protejam todo o sistema cardiovascular (Tabela 3 **Erro! A origem da referência não foi encontrada.**). As abordagens incidem principalmente na utilização do fator de crescimento dos fibroblastos e do fator de crescimento endotelial visando a redução da isquemia miocárdica como consequência da doença coronária, e a isquemia límbica inferior consequente da doença vascular periférica.

### 6.3.3. Doenças monogénicas

Este grupo de doenças está na origem de todo o interesse e investimento em terapia gênica, sendo de todos os alvos terapêuticos, o que mostra melhores resultados. A correção destas desordens, baseadas na anomalia de único gene, baseia-se na transferência de um análogo saudável do gene defeituoso para células estaminais em divisão de modo a assegurar a permanência da correção.

São inúmeras as doenças monogénicas que são potenciais alvos da terapia génica, como resumido na Tabela 3.

A fibrose quística é a doença-alvo monogénica em que mais ensaios clínicos têm vindo a ser testados (22.4% das doenças-alvo monogénicas), devido à sua elevada prevalência na população da Europa e EUA, em que os afetados têm uma esperança média de vida inferior a 40 anos (Farrell, 2008).

Outros grandes alvos terapêuticos são as síndromes das imunodeficiências combinadas, representando 20% das doenças-alvo monogénicas.

**Tabela 3.** Potencialidades da terapia génica no tratamento de doenças cardiovasculares e monogénicas.

<b>Doenças cardiovasculares</b>	<b>Doenças monogénicas</b>
Anemia	$\beta$ -Talassémia
<i>Angina pectoris</i>	Fibrose quística
Estenose da artéria coronária	Hemofilia A e B
Isquémia límbica crítica	Imunodeficiência Combinada Severa
Falha cardíaca	Doença granulomatosa crónica
Isquémia miocárdica	Hipercolesterolémia familiar
Doença vascular periférica	Deficiência na $\alpha$ -1 antitripsina
Hipertensão pulmonar	Galactosialidose
Úlceras venosas	Deficiência na lipoproteína lipase

#### 6.3.4. Outras doenças

De todos os outros grupos de doenças, o que está a ser explorado mais intensamente é o das doenças infecciosas (8.0% do total dos ensaios clínicos), destacando-se a infeção do VIH devido à sua elevada prevalência a nível mundial e à

inexistência de quaisquer outros tratamentos eficazes. Infecções pelo citomegalovírus, adenovírus e tétano também tem sido alvo de alguns dos estudos.

Em termos de doenças inflamatórias, a colite ulcerosa e as artrites reumatóides, inflamatórias e degenerativas são os principais alvos terapêuticos.

Outros grupos de doenças que também estão a ser alvo de ensaios clínicos estão especificados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Potencialidades da terapia gênica no tratamento de doenças infecciosas, neurológicas, inflamatórias e oculares.

<b>Doenças infecciosas</b>	<b>Doenças neurológicas</b>
Infeção por adenovírus	Doença de <i>Alzheimer</i>
Infeção por citomegalovírus	Epilepsia
VIH/SIDA	Esclerose múltipla
Tuberculose	Doença de <i>Parkinson</i>
Influenza	Neuropatia (diabética e periférica)
Tétano	Dor
<b>Doenças inflamatórias</b>	<b>Doenças oculares</b>
Artrite (reumatoide, inflamatória e degenerativa)	Glaucoma
Colite ulcerosa	Retinite pigmentosa
Doença inflamatória severa do reto	Degeneração macular
Osteoartrite	Edema macular diabético

#### 6.4. Produtos biotecnológicos desenvolvidos

As etapas iniciais do desenvolvimento de tecnologias e elaboração de ensaios pré-clínicos para terapia gênica têm facilmente investimentos com capital público, dados os custos relativamente baixos que comportam. Dai que, numa fase inicial, as investigações sejam desenvolvidas por grupos de pesquisa, faculdades e algumas

entidades públicas e privadas. Ao transferir essas pesquisas para laboratórios de ensaios clínicos, em momentos mais avançados de conhecimento, a demanda de recursos já não é comportada tão facilmente pelo financiamento público e começam a surgir algumas limitações. A este nível as companhias de biotecnologia são quem investe em ensaios clínicos, visando a elaboração de patentes que tenham valor comercial, quer para aplicações clínicas, quer em aplicações em quaisquer outras áreas de tecnologia (Linden, 2010).

Até ao início do ano de 2010 apenas um produto foi comercializado para ser usado em terapia gênica; contudo outros produtos, já em fase IV, encontram-se em fase avançada de desenvolvimento, a caminho da comercialização (Tabela 5).

**Tabela 5.** Medicamentos usados em terapia gênica em estado avançado de desenvolvimento.  
Adaptado de Linden (2010)

Medicamento	Composição	Indicação	Empresa	Situação atual
<i>Gendicine</i> ®	rAd-p53	Tumores da cabeça e pescoço	<i>SiBiono GenTech</i> (China)	Aprovado (China, 2003)
<i>Rexin-G</i> ®	Marcador tumoral + retroV-dnG1-Cyclin	Tumores sólidos	<i>Epeius Biotech</i> (EUA)	Uso compassionado (Japão, 2007) Aprovado (Filipinas)
<i>Collategene</i> ®	Plasmídeo-HGF	Isquemia crítica dos membros	<i>AnGes MG e Daiichi Sankyo</i> (Japão)	Em revisão (Japão) Análise de protocolo especial (EUA)
<i>Advexin</i> ®	rAd5CMV-p53	Tumores da cabeça e pescoço	<i>Introgen</i> (EUA)	Ensaio fase II
<i>Cerepro</i> ®	rAd5-TK	Glioblastoma	<i>Ark Technologies</i> (Inglaterra e Finlândia)	Aprovado para uso individualizado (França e Finlândia, 2009)

O interesse do setor industrial para estas abordagens terapêuticas está intimamente relacionado com os avanços científico-tecnológicos que ocorrem ao longo

do tempo, ou seja, o crescimento do investimento industrial ocorre com o crescimento do conhecimento científico.

## 7. Problemas e perspectivas futuras

A terapia génica, apesar de hoje em dia estar muito mais desenvolvida que há 20 anos em termos de segurança e de aplicabilidade clínica, teve um mau começo com o tratamento de dois pacientes na década de 1970 e de outros dois pacientes em 1980, em ensaios clínicos não aprovados. No primeiro ensaio foi usada uma forma selvagem do papiloma vírus como tratamento *in vivo* da deficiência da enzima arginase e no segundo ensaio recorreu-se a um plasmídeo com  $\beta$ -globina como terapia *ex vivo* para a  $\beta$ -Talassemia. Em nenhum dos ensaios foi demonstrado qualquer efeito nefasto ou benéfico, pondo em causa a utilidade destas abordagens (Wolff & Lederberg, 1994).

Em 1990, o primeiro ensaio de terapia génica foi aprovado para o tratamento da SCID com um retrovírus, e apesar de ter sido provado que o retrovírus transfetava as células-alvo, novamente não se obteve qualquer resultado positivo no tratamento da doença. Em 1999 a morte de um paciente de 18 anos, que participou num ensaio de terapia génica para uma doença hepática, fez com que a opinião pública criticasse a segurança e utilidade deste tipo de abordagem terapêutica, resultando numa grande retração do seu desenvolvimento (Scolley, 2001).

Estes acontecimentos, e outros relatados posteriormente, tiveram grande impacto na comunidade científica, levando a uma maior preocupação sobre o controlo de todas as variáveis do ensaio de modo a eliminar o mais possível a ocorrência de resultados negativos (Tabela 6). Começou a estudar-se mais pormenorizadamente, quer a biologia dos vírus e os seus mecanismos de infeção, quer a biologia e transdução celular para melhor seleccionar o vetor a utilizar em terapêuticas *in vivo* e *ex vivo*.

A viragem de milénio constituiu igualmente uma viragem na tecnologia da terapia génica, observando-se, duas décadas depois do início dos ensaios clínicos de terapia génica, mais de 1700 ensaios clínicos aprovados em todo o mundo, que não só recolheram nova informação e conhecimento sobre terapia génica como também levaram a perceber o medo que persiste na sociedade relativamente às terapêuticas de índole genética (Wirth & Yla-Herttuala, 2013).

**Tabela 6.** Vítimas de terapia gênica. Adaptado de *Wirth et al.* (2013).

Ano	Doença-Alvo	Vetor	Comentário	Morte associada a terapia gênica?
1999	Deficiência da ornitina transcarbamilase	Adenovírus	Paciente morreu por choque anafilático 4 dias após infusão do vetor.	Sim
2002	Imunodeficiência combinada severa ligada ao X	Retrovírus	Doente desenvolveu leucemia devido á ligação do vetor com o promotor oncogénico LMO2.	Sim
2006	Doença granulomatosa crónica ligada ao X	Retrovírus	Perda da expressão do transgene levou a morte por doença subjacente.	Não

Um ciclo semelhante de bons e maus resultados foi também observado no uso de anticorpos monoclonais em aplicações clínicas, onde inicialmente havia grande expectativa em relação ao seu potencial uso médico devido aos resultados pré-clínicos alcançados, que se traduziu em 10 anos de falhas clínicas e problemas que colocaram em causa a mais-valia desta abordagem. Mais tarde, com os avanços no conhecimento sobre os diversos mecanismos envolvidos, solucionaram-se os problemas inerentes à sua utilização, tornando-se um dos mais bem-sucedidos avanços do ponto de vista clínico, biotecnológico e comercial (Scollay, 2001). Resta saber se a terapia gênica alcançará os mesmos resultados inovadores.

A existência de inúmeras doenças incuráveis pelos métodos terapêuticos convencionais atualmente disponíveis representam a maior perspectiva futura de aplicação da terapia gênica. O desenvolvimento de sistemas de empacotamento viral altamente eficientes e o refinamento dos processos de purificação e concentração poderão melhorar os títulos dos vetores virais para valores que permitam a transferência sistêmica de maior quantidade de genes sem riscos para a saúde, o que certamente ampliará as oportunidades para o uso da terapia gênica no contexto clínico (Dani, 2000).

Globalmente, os conceitos e as ideias desenvolvidas em torno da terapia gênica estão, hoje em dia, bastante mais avançados do que as metodologias necessárias para satisfazer esses objetivos. Apesar de muitos protocolos clínicos terem sido aprovados para a transferência de genes em humanos, os benefícios alcançados até ao momento não atingiram as propostas iniciais.

De facto, algumas barreiras ainda necessitam ser transpostas para que sejam alcançados os resultados pretendidos. Muitos esforços no campo da pesquisa básica ainda são necessários para que a terapia génica possa realmente proporcionar uma melhoria significativa na saúde dos pacientes, sem quaisquer riscos, e representar uma prática rotineira bem-sucedida no futuro.

Os métodos de transferência génica disponíveis, apesar de serem cada vez mais eficazes, nem sempre são eficientes no que respeita ao direccionamento celular. Com o desenvolvimento de sistemas vetoriais híbridos, a combinação das vantagens dos vetores virais e não-virais, pode proporcionar uma melhoria na eficiência de transfeção e na manutenção a longo prazo da expressão do gene de interesse *in vivo*. Contudo, persistem ainda problemas como a baixa expressão e a ausência de mecanismos precisos de regulação do gene de interesse na célula-alvo, dificultando o avanço da terapia génica como ferramenta terapêutica. Outro dos problemas mais presentes é o facto da utilização de vetores virais em ensaios clínicos em humanos levantar questões sobre a segurança do método em relação à mutagénese insercional e o alto potencial imunogénico desses vírus, sendo esta ainda a principal barreira ao desenvolvimento da terapia génica para a prática médica (Linden, 2010).

O maior entendimento da medicina molecular e da engenharia genética, aliado ao estudo mais aprofundado dos mecanismos relacionados com a regulação da expressão génica, pode permitir uma modulação mais eficaz das regiões promotoras e a consequente ativação/inativação do gene de interesse *in vivo*. Uma melhor caracterização e o desenvolvimento de técnicas para a identificação e o isolamento das células-alvo podem facilitar o direccionamento dos vetores e aumentar a eficiência de transfeção (Wirth & Yla-Herttuala, 2013).

Vários protocolos, desenvolvidos recentemente, parecem ser uma grande promessa dos quais se destacam o uso da terapia génica no tratamento da hemofilia B e na deficiência da lipoproteína lípase no adulto. Em ambos os ensaios clínicos foi observado um efeito benéfico, embora apenas transitório devido a uma reação imunológica contra os constituintes dos vetores que levou à destruição das células corrigidas por esse vetor. Com estes dados, novos protocolos foram desenvolvidos e postos em prática de modo a modular o sistema imunitário e a inativar transitoriamente a sua ação supressora (Sack & Herzog, 2009). Seguiu-se então um novo estudo, com seis pacientes, no qual foram utilizadas várias doses de VAA recombinante contendo promotores hepáticos específicos e o codão do gene FIX (necessário à coagulação).



Após 16 meses, os pacientes, apresentaram melhorias, tendo quatro deles deixado a terapêutica e mantendo-se livres de hemorragias espontâneas, características da doença. Só os pacientes a que foram administradas as maiores concentrações do vetor apresentaram alterações das proteínas séricas. Esta abordagem demonstrou o seu potencial de conversão da doença grave em estados mais controláveis ou mesmo na reversão completa da hemofilia B (Nathwani et al., 2011).

A descoberta, por Takahashi e Yamanaka (2006), da possibilidade de reprogramação das células somáticas de volta ao seu estado de pluripotência foi um dos maiores avanços nesta área, potenciando a terapia génica e celular, e abrindo portas no campo da medicina regenerativa. Estas células, denominadas de células estaminais indutoras de pluripotência (do inglês *induced pluripotent stem cells*, iPS), assemelham-se às células estaminais embrionárias, quer na sua morfologia e propriedades de crescimento, quer na expressão dos marcadores celulares. Esta pesquisa ainda se encontra num estado preliminar, sendo necessário resolver algumas questões práticas até à sua consolidação clínica (K. Takahashi et al., 2007; K. Takahashi & Yamanaka, 2006).

Outro avanço, não menos importante, foi a criação dos cromossomas artificiais humanos que têm a possibilidade de empacotar genes de grandes dimensões (e.g. distrofina), o que não se consegue com o uso de outros sistemas vetoriais, permitindo aumentar o leque de doenças possíveis de serem tratadas pela terapia génica, como é o caso da distrofia muscular de *Duchenne* (Kazuki et al., 2010).

À parte das lacunas de conhecimento na técnica para a veiculação e tratamento eficaz dos estados patológicos, outros temas têm vindo a ser analisados detalhadamente de modo a poder prosseguir-se com a implementação global da terapia génica, sendo a perceção pública, a produção em massa e o valor comercial dessa implementação os mais debatidos.

A perceção pública e os avanços da terapia génica influenciam-se mutuamente, sendo um grande desafio para a ciência encontrar um ponto de equilíbrio. De facto há uma grande preocupação da sociedade acerca de tudo o que tenha a ver com a engenharia genética e os organismos modificados geneticamente. O caso da morte do paciente em 1999, a clonagem da ovelha *Dolly* e os animais transgénicos são exemplos que geraram grande controvérsia no avanço da engenharia genética. Portanto, é crucial que no futuro sejam conseguidos resultados satisfatórios para que a população receba

positivamente a terapia génica como uma realidade e não crie resistência ao seu desenvolvimento.

A possibilidade de produção em massa consiste um dos obstáculos mais significantes no desenvolvimento do melhor sistema vetorial. A dificuldade reside no controlo da mutação viral e recombinação dos vetores, a uma escala comercial, de modo a evitar riscos graves para a saúde dos pacientes tratados com vetores virais.

O valor comercial desta abordagem terapêutica é um obstáculo imposto pelas grandes empresas que ao patrocinar as investigações, desejam que as terapias sejam comercializadas como qualquer outra terapia de índole medicamentosa, pressionando os investigadores a desenvolverem terapêuticas com um mercado o mais global possível. Terapêuticas para doenças raras, devidas a mutações monogénicas, não são tão atrativas de desenvolver pelos retornos monetários serem menores, quando comparados com terapêuticas de doenças mais comuns (*e.g.* patologias cardiovasculares, infecciosas e cancerígenas).

As doenças monogénicas, dado que a anomalia está presente num único gene, estão melhor definidas, constituindo alvos mais fáceis da terapia génica. Doenças multifactoriais são um obstáculo mais difícil de transpor por parte dos investigadores, mas, como poderá levar a maiores retornos se desenvolvidas terapêuticas, a atenção incide nestas. Esta pressão para o tratamento de grandes indicações, como o cancro, é uma das principais razões que levam muitos ensaios clínicos a resultados inconclusivos. As principais lacunas são a falta de conhecimento acerca dos mecanismos de entrega do gene e da eficácia do gene uma vez inserido.

A nível comercial surge ainda o problema das patentes e da propriedade intelectual. Poucos são os centros de investigação que englobam as licenças de todos os elementos necessários para o desenvolvimento completo de um tratamento e as *royalties* para o uso das patentes são muitas vezes uma limitação ao uso de métodos e componentes patenteados por outra empresa.

Para a implementação equilibrada da terapia génica é necessário que se comece pelo tratamento de doenças mais simples, apesar de menos rentáveis, de modo a alcançar resultados positivos que atraiam quer maiores investimentos por parte das grandes empresas quer uma maior aceitação por parte da comunidade científica e da sociedade. Isto, aliado à cooperação entre os diversos centros científicos, poderá ser o impulso necessário sucessos futuros.

## Bibliografia

- Ambesajir, A., Kaushik, A., Kaushik, J. J., & Petros, S. T. (2012). RNA interference: A futuristic tool and its therapeutic applications. *Saudi J Biol Sci*, 19(4), 395-403. doi: 10.1016/j.sjbs.2012.08.001
- Aranda, A., Ruiz-Guillen, M., Quetglas, J. I., Bezunartea, J., Casales, E., & Smerdou, C. (2011). Recent patents on alphavirus protein expression and vector production. *Recent Pat Biotechnol*, 5(3), 212-226.
- Argnani, R., Lufino, M., Manservigi, M., & Manservigi, R. (2005). Replication-competent herpes simplex vectors: design and applications. *Gene Ther*, 12 Suppl 1, S170-177. doi: 10.1038/sj.gt.3302622
- Atkins, G. J., Fleeton, M. N., & Sheahan, B. J. (2008). Therapeutic and prophylactic applications of alphavirus vectors. *Expert Rev Mol Med*, 10, e33. doi: 10.1017/S1462399408000859
- Auman, J. T. (2010). Gene therapy: Have the risks associated with viral vectors been solved? *Curr Opin Mol Ther*, 12(6), 637-638.
- Ayuso, E., Mingozzi, F., & Bosch, F. (2010). Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Curr Gene Ther*, 10(6), 423-436.
- Bartoli, A., Fettucciari, K., Fetriconi, I., Rosati, E., Di Ianni, M., Tabilio, A., Marconi, P. (2003). Effect of trichostatin a and 5'-azacytidine on transgene reactivation in U937 transduced cells. *Pharmacol Res*, 48(1), 111-118.
- Bogoslovskaja, E. V., Glazkova, D. V., Shipulin, G. A., & Pokrovskii, V. V. (2012). [Safety of retroviral vectors in gene therapy]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*(10), 55-61.
- Bottega, R., & Epand, R. M. (1992). Inhibition of protein kinase C by cationic amphiphiles. *Biochemistry*, 31(37), 9025-9030.
- Brisson, M., He, Y., Li, S., Yang, J. P., & Huang, L. (1999). A novel T7 RNA polymerase autogene for efficient cytoplasmic expression of target genes. *Gene Ther*, 6(2), 263-270. doi: 10.1038/sj.gt.3300827
- Burshtyn, D. N. (2013). NK cells and poxvirus infection. *Front Immunol*, 4, 7. doi: 10.3389/fimmu.2013.00007

- Burton, E. A., Fink, D. J., & Glorioso, J. C. (2005). Replication-defective genomic HSV gene therapy vectors: design, production and CNS applications. *Curr Opin Mol Ther*, 7(4), 326-336.
- Calabretta, B., Skorski, T., Szczalik, C., & Zon, G. (1993). Prospects for gene-directed therapy with antisense oligodeoxynucleotides. *Cancer Treat Rev*, 19(2), 169-179.
- Carey, J., & White, B. (2003). Genetic Testing and Gene Therapy. In Mosby (Ed.), *Medical Genetics* (3<sup>a</sup> ed., pp. 296-302).
- Chang, A. H., & Sadelain, M. (2007). The genetic engineering of hematopoietic stem cells: the rise of lentiviral vectors, the conundrum of the ltr, and the promise of lineage-restricted vectors. *Mol Ther*, 15(3), 445-456. doi: 10.1038/sj.mt.6300060
- Chen, Z., He, Y., Shi, B., & Yang, D. (2013). Human serum albumin from recombinant DNA technology: Challenges and strategies. *Biochim Biophys Acta*. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.04.037
- Choi, V. W., McCarty, D. M., & Samulski, R. J. (2005). AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther*, 5(3), 299-310.
- Cornetta, K., Pollok, K. E., & Miller, A. D. (2008a). Generation of stable vector-producing cells for retroviral vectors. *CSH Protoc*, 2008, pdb prot4882. doi: 10.1101/pdb.prot4882
- Cornetta, K., Pollok, K. E., & Miller, A. D. (2008b). Transduction of cell lines by retroviral vectors. *CSH Protoc*, 2008, pdb prot4883. doi: 10.1101/pdb.prot4883
- Couto, L. B. (2004). Preclinical gene therapy studies for hemophilia using adeno-associated virus (AAV) vectors. *Semin Thromb Hemost*, 30(2), 161-171. doi: 10.1055/s-2004-825630
- Dani, S. U. (2000). Terapia Génica: Vectores para terapia génica. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 28-33.
- Das, M., Mukhopadhyay, S., & De, R. (2011). Gradient Descent Optimization in Gene Regulatory Pathways. *PLoS One*, 5(9), 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0012475.g001
- Dass, C. R., & Su, T. (2000). Delivery of lipoplexes for gene therapy of solid tumours: role of vascular endothelial cells. *J Pharm Pharmacol*, 52(11), 1301-1317.
- Davison, A. J., & Bhella, D. (2007). Comparative genome and virion structure. In A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P. S. Moore, B. Roizman, R. Whitley

- & K. Yamanishi (Eds.), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge.
- Deakin, C. T., Alexander, I. E., Hooker, C. A., & Kerridge, I. H. (2013). Gene therapy researchers' assessments of risks and perceptions of risk acceptability in clinical trials. *Mol Ther*, 21(4), 806-815. doi: 10.1038/mt.2012.230
- Deakin, C. T., Alexander, I. E., & Kerridge, I. (2010). The ethics of gene therapy: balancing the risks. *Curr Opin Mol Ther*, 12(5), 578-585.
- Drake, D. M., Keswani, R. K., & Pack, D. W. (2010). Effect of serum on transfection by polyethylenimine/virus-like particle hybrid gene delivery vectors. *Pharm Res*, 27(11), 2457-2465. doi: 10.1007/s11095-010-0238-z
- Elouahabi, A., & Ruysschaert, J. M. (2005). Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Mol Ther*, 11(3), 336-347. doi: 10.1016/j.ymthe.2004.12.006
- Escors, D., & Breckpot, K. (2010). Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 58(2), 107-119. doi: 10.1007/s00005-010-0063-4
- Farrell, P. M. (2008). The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J Cyst Fibros*, 7(5), 450-453. doi: 10.1016/j.jcf.2008.03.007
- Fischer, A., Hacein-Bey-Abina, S., & Cavazzana-Calvo, M. (2013). Gene therapy of primary T cell immunodeficiencies. *Gene*. doi: 10.1016/j.gene.2013.03.092
- Fischer, D., Bieber, T., Li, Y., Elsassner, H. P., & Kissel, T. H. (1999). A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm. Res.*, 16, 1273-1279.
- Forrest, M. L., & Pack, D. W. (2002). On the kinetics of polyplex endocytic trafficking: implications for gene delivery vector design. *Mol Ther*, 6(1), 57-66.
- Friend, D. S., Papahadjopoulos, D., & Debs, R. J. (1996). Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1278(1), 41-50.
- Fukuhara, H., & Homma, Y. (2011). [Oncolytic virus therapy using herpes simplex virus 1(HSV-1)]. *Nihon Rinsho*, 69 Suppl 5, 564-567.
- Funhoff, A. M., van Nostrum, C. F., Lok, M. C., Kruijtzer, J. A., Crommelin, D. J., & Hennink, W. E. (2005). Cationic polymethacrylates with covalently linked

- membrane destabilizing peptides as gene delivery vectors. *J. Control. Release*, 101, 233-246.
- Gabriel, R., Schmidt, M., & von Kalle, C. (2012). Integration of retroviral vectors. *Curr Opin Immunol*, 24(5), 592-597. doi: 10.1016/j.coi.2012.08.006
- Gardlik, R. (2012). Inducing pluripotency using in vivo gene therapy. *Med Hypotheses*, 79(2), 197-201. doi: 10.1016/j.mehy.2012.04.034
- Gardlik, R., Palffy, R., Hodosy, J., Lukacs, J., Turna, J., & Celec, P. (2005). Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit*, 11(4), RA110-121.
- Gholami, S., Haddad, D., Chen, C. H., Chen, N. G., Zhang, Q., Zanzonico, P. B., Fong, Y. (2011). Novel therapy for anaplastic thyroid carcinoma cells using an oncolytic vaccinia virus carrying the human sodium iodide symporter. *Surgery*, 150(6), 1040-1047. doi: 10.1016/j.surg.2011.09.010
- Giacca, M., & Zacchigna, S. (2012). Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *J Control Release*, 161(2), 377-388. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.04.008
- Ginn, S. L., Alexander, I. E., Edelstein, M. L., Abedi, M. R., & Wixon, J. (2013). Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *J Gene Med*, 15(2), 65-77. doi: 10.1002/jgm.2698
- Glover, D. J., Lipps, H. J., & Jans, D. A. (2005). Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat Rev Genet*, 6(4), 299-310. doi: 10.1038/nrg1577
- Gonzalez-Alegre, P. (2008). [Therapeutic RNA interference for neurodegenerative diseases]. *Rev Neurol*, 47(12), 641-647.
- Grant, J. K., Yin, N. C., Zaytoun, A. M., Waseem, H., & Hobbs, J. A. (2009). Persistent adeno-associated virus 2 and parvovirus B19 sequences in post-mortem human cerebellum. *Cerebellum*, 8(4), 490-498. doi: 10.1007/s12311-009-0126-4
- Gregory-Evans, K., Bashar, A. M., & Tan, M. (2012). Ex vivo gene therapy and vision. *Curr Gene Ther*, 12(2), 103-115.
- Guillaume, C., Delepine, P., Droal, C., Montier, T., Tymen, G., & Claude, F. (2001). Aerosolization of cationic lipid-DNA complexes: lipoplex characterization and optimization of aerosol delivery conditions. *Biochem Biophys Res Commun*, 286(3), 464-471. doi: 10.1006/bbrc.2001.5418
- Hackett, P. B., Largaespada, D. A., Switzer, K. C., & Cooper, L. J. (2013). Evaluating risks of insertional mutagenesis by DNA transposons in gene therapy. *Transl Res*, 161(4), 265-283. doi: 10.1016/j.trsl.2012.12.005

- Hafez, I. M., Maurer, N., & Cullis, P. R. (2001). On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene Ther*, 8(15), 1188-1196. doi: 10.1038/sj.gt.3301506
- Hida, K., Lai, S. K., Suk, J. S., Won, S. Y., Boyle, M. P., & Hanes, J. (2011). Common gene therapy viral vectors do not efficiently penetrate sputum from cystic fibrosis patients. *PLoS One*, 6(5), e19919. doi: 10.1371/journal.pone.0019919
- Hildinger, M., Auricchio, A., Gao, G., Wang, L., Chirmule, N., & Wilson, J. M. (2001). Hybrid vectors based on adeno-associated virus serotypes 2 and 5 for muscle-directed gene transfer. *J Virol*, 75(13), 6199-6203. doi: 10.1128/JVI.75.13.6199-6203.2001
- Huang, S., & Kamihira, M. (2013). Development of hybrid viral vectors for gene therapy. *Biotechnol Adv*, 31(2), 208-223. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.10.001
- Huckriede, A., Bungener, L., Daemen, T., & Wilschut, J. (2003). Influenza virosomes in vaccine development. *Methods Enzymol*, 373, 74-91. doi: 10.1016/S0076-6879(03)73005-5
- Iwami, K., Natsume, A., & Wakabayashi, T. (2010). Gene therapy for high-grade glioma. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 50(9), 727-736.
- Kairemo, K. J., Tenhunen, M., & Jekunen, A. P. (1998). Gene therapy using antisense oligodeoxynucleotides labeled with Auger-emitting radionuclides. *Cancer Gene Ther*, 5(6), 408-412.
- Kazuki, Y., Hiratsuka, M., Takiguchi, M., Osaki, M., Kajitani, N., Hoshiya, H., Oshimura, M. (2010). Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther*, 18(2), 386-393. doi: 10.1038/mt.2009.274
- Keswani, R. K., Pozdol, I. M., & Pack, D. W. (2013). Design of hybrid lipid/retroviral-like particle gene delivery vectors. *Mol Pharm*, 10(5), 1725-1735. doi: 10.1021/mp300561y
- Kunath, K., von Harpe, A., Fischer, D., Petersen, H., Bickel, U., Voigt, K., & Kissel, T. H. (2003). Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J. Control. Release*, 89, 113-125.
- Kundu, P. P., & Sharma, V. (2008). Synthetic polymeric vectors in gene therapy. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 12(5-6), 89-102. doi: 10.1016/j.cossms.2009.01.005

- Kustikova, O., Brugman, M., & Baum, C. (2010). The genomic risk of somatic gene therapy. *Semin Cancer Biol*, 20(4), 269-278. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.06.003
- Laimbacher, A. S., & Fraefel, C. (2012). Gene delivery using helper virus-free HSV-1 amplicon vectors. *Curr Protoc Neurosci, Chapter 4*, Unit 4 14. doi: 10.1002/0471142301.ns0414s60
- Lam, P. Y., & Breakefield, X. O. (2000). Hybrid vector designs to control the delivery, fate and expression of transgenes. *J Gene Med*, 2(6), 395-408. doi: 10.1002/1521-2254(200011/12)2:6<395::AID-JGM146>3.0.CO;2-K
- Lentz, T. B., Gray, S. J., & Samulski, R. J. (2012). Viral vectors for gene delivery to the central nervous system. *Neurobiol Dis*, 48(2), 179-188. doi: 10.1016/j.nbd.2011.09.014
- Li, C., Narkbunnam, N., Samulski, R. J., Asokan, A., Hu, G., Jacobson, L. J., Joint Outcome Study, I. (2012). Neutralizing antibodies against adeno-associated virus examined prospectively in pediatric patients with hemophilia. *Gene Ther*, 19(3), 288-294. doi: 10.1038/gt.2011.90
- Li, H., & Zhang, X. (2010). Oncolytic HSV as a vector in cancer immunotherapy. *Methods Mol Biol*, 651, 279-290. doi: 10.1007/978-1-60761-786-0\_16
- Lin, C., & Engbersen, J. F. (2008). Effect of chemical functionalities in poly(amido amine)s for non-viral gene transfection. *J Control Release*, 132(3), 267-272. doi: 10.1016/j.jconrel.2008.06.022
- Linden, R. (2010). Terapia Génica: O que é, o que não é e o que será. *Estudos Avançados*, 24(70), 31-69.
- Liu, Cai, Y., Cao, X., Wei, R. C., Li, H. L., Zhou, X. M., . . . Liu, X. Y. (2012). A new oncolytic adenoviral vector carrying dual tumour suppressor genes shows potent anti-tumour effect. *J Cell Mol Med*, 16(6), 1298-1309. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01396.x
- Liu, T. C., & Kirn, D. (2008). Gene therapy progress and prospects cancer: oncolytic viruses. *Gene Ther*, 15(12), 877-884. doi: 10.1038/gt.2008.72
- Lo, H. L., & Yee, J. K. (2007). Production of vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G) pseudotyped retroviral vectors. *Curr Protoc Hum Genet, Chapter 12*, Unit 12 17. doi: 10.1002/0471142905.hg1207s52
- Lundstrom, K. (2002). Alphavirus vectors as tools in cancer gene therapy. *Technol Cancer Res Treat*, 1(1), 83-88.



- Lundstrom, K., & Boulikas, T. (2003). Viral and non-viral vectors in gene therapy: technology development and clinical trials. *Technol Cancer Res Treat*, 2(5), 471-486.
- Ly, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S., & Yan, J. (2006). Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release*, 114(1), 100-109. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.04.014
- Mac Gabhann, F., Annex, B. H., & Popel, A. S. (2010). Gene therapy from the perspective of systems biology. *Curr Opin Mol Ther*, 12(5), 570-577.
- Mammen, B., Ramakrishnan, T., Sudhakar, U., & Vijayalakshmi. (2007). Principles of gene therapy. *Indian J Dent Res*, 18(4), 196-200.
- Manganini, M., Serafini, M., Bambacioni, F., Casati, C., Erba, E., Follenzi, A., Intronà, M. (2002). A human immunodeficiency virus type 1 pol gene-derived sequence (cPPT/CTS) increases the efficiency of transduction of human nondividing monocytes and T lymphocytes by lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*, 13(15), 1793-1807. doi: 10.1089/104303402760372909
- Manilla, P., Rebello, T., Afable, C., Lu, X., Slepishkin, V., Humeau, L. M., Dropulic, B. (2005). Regulatory considerations for novel gene therapy products: a review of the process leading to the first clinical lentiviral vector. *Hum Gene Ther*, 16(1), 17-25. doi: 10.1089/hum.2005.16.17
- Mansfield, D., Pencavel, T., Kyula, J. N., Zaidi, S., Roulstone, V., Thway, K., Harrington, K. J. (2013). Oncolytic Vaccinia virus and radiotherapy in head and neck cancer. *Oral Oncol*, 49(2), 108-118. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.07.019
- Mansouri, S., Lavigne, P., Corsi, K., Benderdour, M., Beaumont, E., & Fernandes, J. C. (2004). Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *Eur J Pharm Biopharm*, 57(1), 1-8.
- Marconi, P., Manservigi, R., & Epstein, A. L. (2010). HSV-1-derived helper-independent defective vectors, replicating vectors and amplicon vectors, for the treatment of brain diseases. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 13(2), 169-183.
- Marsh, J. C., Goldfarb, J., Shafman, T. D., & Diaz, A. Z. (2013). Current status of immunotherapy and gene therapy for high-grade gliomas. *Cancer Control*, 20(1), 43-48.
- Martini, S. V., Rocco, P. R., & Morales, M. M. (2011). Adeno-associated virus for cystic fibrosis gene therapy. *Braz J Med Biol Res*, 44(11), 1097-1104.

- Mello, C. C., & Conte, D., Jr. (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature*, 431(7006), 338-342. doi: 10.1038/nature02872
- Menck, C. F. M., & Ventura, A. M. (2007). Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica. *Universidade de São Paulo*, 75, 50-61.
- Merlin, J. L., N'Doye, A., Bouriez, T., & Dolivet, G. (2002). Polyethylenimine Derivatives as Potent Nonviral Vectors for Gene Transfer. *Drug News Perspect*, 15(7), 445-451.
- Miller, A. D. (1992). Retroviral vectors. *Curr Top Microbiol Immunol*, 158, 1-24.
- Mirska, D., Schirmer, K., Funari, S. S., Langner, A., Dobner, B., & Brezesinski, G. (2005). Biophysical and biochemical properties of a binary lipid mixture for DNA transfection. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 40(1), 51-59. doi: 10.1016/j.colsurfb.2004.10.007
- Montgomery, M. K. (2004). RNA interference: historical overview and significance. *Methods Mol Biol*, 265, 3-21. doi: 10.1385/1-59259-775-0:003
- Morgan, J. L., & Kerschensteiner, D. (2011). Shooting DNA, dyes, or indicators into tissue slices using the gene gun. *Cold Spring Harb Protoc*, 2011(12), 1512-1514. doi: 10.1101/pdb.prot067074
- Morishita, R., Aoki, M., & Kaneda, Y. (2001). Decoy oligodeoxynucleotides as novel cardiovascular drugs for cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci*, 947, 294-301; discussion 301-292.
- Moroziewicz, D., & Kaufman, H. L. (2005). Gene therapy with poxvirus vectors. *Curr Opin Mol Ther*, 7(4), 317-325.
- Mueller, C., Ratner, D., Zhong, L., Esteves-Sena, M., & Gao, G. (2012). Production and discovery of novel recombinant adeno-associated viral vectors. *Curr Protoc Microbiol*, Chapter 14, Unit14D 11. doi: 10.1002/9780471729259.mc14d01s26
- Nardi, N. B., Teixeira, L. A., & Silva, E. F. A. (2002). Terapia Gênica. *Ciência & Saúde Coletiva*, 7(1), 109-116.
- Nathwani, A. C., Tuddenham, E. G., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D. C., Davidoff, A. M. (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med*, 365(25), 2357-2365. doi: 10.1056/NEJMoa1108046
- Neve, R. L. (2012). Overview of gene delivery into cells using HSV-1-based vectors. *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 4, Unit 4 12. doi: 10.1002/0471142301.ns0412s61

- Niu, H. X., Du, T., Xu, Z. F., Zhang, X. K., & Wang, R. G. (2012). Role of wild type p53 and double suicide genes in interventional therapy of liver cancer in rabbits. *Acta Cir Bras*, 27(8), 522-528.
- Okuda, T., Sugiyama, A., Niidome, T., & Aoyagi, H. (2004). Characters of dendritic poly(L-lysine) analogues with the terminal lysines replaced with arginines and histidines as gene carriers in vitro. *Biomaterials*, 25, 537-544.
- Osada, T., Morse, M. A., Hobeika, A., & Lyerly, H. K. (2012). Novel recombinant alphaviral and adenoviral vectors for cancer immunotherapy. *Semin Oncol*, 39(3), 305-310. doi: 10.1053/j.seminoncol.2012.02.013
- Pantaleo, G., Esteban, M., Jacobs, B., & Tartaglia, J. (2010). Poxvirus vector-based HIV vaccines. *Curr Opin HIV AIDS*, 5(5), 391-396. doi: 10.1097/COH.0b013e32833d1e87
- Parato, K. A., Breitbach, C. J., Le Boeuf, F., Wang, J., Storbeck, C., Ilkow, C., Bell, J. C. (2012). The oncolytic poxvirus JX-594 selectively replicates in and destroys cancer cells driven by genetic pathways commonly activated in cancers. *Mol Ther*, 20(4), 749-758. doi: 10.1038/mt.2011.276
- Parker, A. L., Newman, C., Briggs, S., Seymour, L., & Sheridan, P. J. (2003). Lipoplex-mediated transfection and endocytosis. In C. U. Press (Ed.), *Expert Rev Mol Med* (Vol. 5).
- Parks, R. J. (2000). Improvements in adenoviral vector technology: overcoming barriers for gene therapy. *Clin Genet*, 58(1), 1-11.
- Puntel, M., A, K. M. G., Farrokhi, C., Vanderveen, N., Paran, C., Appelhans, A., Castro, M. G. (2013). Safety profile, efficacy, and biodistribution of a bicistronic high-capacity adenovirus vector encoding a combined immunostimulation and cytotoxic gene therapy as a prelude to a phase I clinical trial for glioblastoma. *Toxicol Appl Pharmacol*, 268(3), 318-330. doi: 10.1016/j.taap.2013.02.001
- Raviprakash, K., & Porter, K. R. (2006). Needle-free injection of DNA vaccines: a brief overview and methodology. *Methods Mol Med*, 127, 83-89. doi: 10.1385/1-59745-168-1:83
- Rayner, J. O., Dryga, S. A., & Kamrud, K. I. (2002). Alphavirus vectors and vaccination. *Rev Med Virol*, 12(5), 279-296. doi: 10.1002/rmv.360
- Ritter, T., Lehmann, M., & Volk, H. D. (2002). Improvements in gene therapy: averting the immune response to adenoviral vectors. *BioDrugs*, 16(1), 3-10.

- Rudolph, C., Muller, R. H., & Rosenecker, J. (2002). Jet nebulization of PEI/DNA polyplexes: physical stability and in vitro gene delivery efficiency. *J Gene Med*, 4(1), 66-74.
- Sack, B. K., & Herzog, R. W. (2009). Evading the immune response upon in vivo gene therapy with viral vectors. *Curr Opin Mol Ther*, 11(5), 493-503.
- Sanders, N. N., Van Rompaey, E., De Smedt, S. C., & Demeester, J. (2002). On the transport of lipoplexes through cystic fibrosis sputum. *Pharm Res*, 19(4), 451-456.
- Satoh, W., Hirai, Y., Tamayose, K., & Shimada, T. (2000). Site-specific integration of an adeno-associated virus vector plasmid mediated by regulated expression of rep based on Cre-loxP recombination. *J Virol*, 74(22), 10631-10638.
- Saydam, O., Glauser, D. L., & Fraefel, C. (2012). Construction and packaging of herpes simplex virus/adeno-associated virus (HSV/AAV) Hybrid amplicon vectors. *Cold Spring Harb Protoc*, 2012(3), 352-356. doi: 10.1101/pdb.prot068114
- Scarzello, M., Chupin, V., Wagenaar, A., Stuart, M. C., Engberts, J. B., & Hulst, R. (2005). Polymorphism of pyridinium amphiphiles for gene delivery: influence of ionic strength, helper lipid content, and plasmid DNA complexation. *Biophys J*, 88(3), 2104-2113. doi: 10.1529/biophysj.104.053983
- Schambach, A., & Baum, C. (2008). Clinical application of lentiviral vectors - concepts and practice. *Curr Gene Ther*, 8(6), 474-482.
- Schatzlein, A. G. (2001). Non-viral vectors in cancer gene therapy: principles and progress. *Anticancer Drugs*, 12(4), 275-304.
- Schmidt-Wolf, G. D., & Schmidt-Wolf, I. G. (2003). Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update. *Trends Mol Med*, 9(2), 67-72.
- Scollay, R. (2001). Gene Therapy - A Brief Overview of the Past, Present, and Future. *Annals New York Academy of Sciences*, 26-30.
- Sen, D., Balakrishnan, B., Gabriel, N., Agrawal, P., Roshini, V., Samuel, R., . . . Jayandharan, G. R. (2013). Improved adeno-associated virus (AAV) serotype 1 and 5 vectors for gene therapy. *Sci Rep*, 3, 1832. doi: 10.1038/srep01832
- Shimamura, M., & Morishita, R. (2011). Naked plasmid DNA for gene therapy. *Curr Gene Ther*, 11(6), 433.
- Silman, N. J., & Fooks, A. R. (2000). Biophysical targeting of adenovirus vectors for gene therapy. *Curr Opin Mol Ther*, 2(5), 524-531.

- Sinn, P. L., Sauter, S. L., & McCray, P. B., Jr. (2005). Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production. *Gene Ther*, 12(14), 1089-1098. doi: 10.1038/sj.gt.3302570
- St George, J. A. (2003). Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther*, 10(14), 1135-1141. doi: 10.1038/sj.gt.3302071
- Sturtevant, A. H., & Lewis, E. B. (2001). A History of Genetics. In C. S. H. L. Press (Ed.), (pp. 9-38). Pasadena, California.
- Suzuki, Y., & Craigie, R. (2007). The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol*, 5(3), 187-196. doi: 10.1038/nrmicro1579
- Takahashi, G., Meshii, N., Hamada, M., Iwai, S., & Yura, Y. (2013). Sequence of a fusogenic herpes simplex virus, RH2, for oncolytic virotherapy. *J Gen Virol*, 94(Pt 4), 726-737. doi: 10.1099/vir.0.044834-0
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861-872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Tan, B. T., Wu, L., & Berk, A. J. (1999). An adenovirus-Epstein-Barr virus hybrid vector that stably transforms cultured cells with high efficiency. *J Virol*, 73(9), 7582-7589.
- Tarahovsky, Y. S. (2009). Cell transfection by DNA-lipid complexes - lipoplexes. *Biochemistry (Mosc)*, 74(12), 1293-1304.
- Tokunaga, M., Hazemoto, N., & Yotsuyanagi, T. (2004). Effect of oligopeptides on gene expression: comparison of DNA/peptide and DNA/peptide/liposome complexes. *Int J Pharm*, 269(1), 71-80.
- Tros de Ilarduya, C., Sun, Y., & Duzgunes, N. (2010). Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur J Pharm Sci*, 40(3), 159-170. doi: 10.1016/j.ejps.2010.03.019
- Tu, G., Kirchmaier, A. L., Liggitt, D., Liu, Y., Liu, S., Yu, W. H., Debs, R. J. (2000). Non-replicating Epstein-Barr virus-based plasmids extend gene expression and can improve gene therapy in vivo. *J Biol Chem*, 275(39), 30408-30416. doi: 10.1074/jbc.M004782200

- Tupin, E., Poirier, B., Bureau, M. F., Khallou-Laschet, J., Vranckx, R., Caligiuri, G., Nicoletti, A. (2003). Non-viral gene transfer of murine spleen cells achieved by in vivo electroporation. *Gene Ther*, 10(7), 569-579. doi: 10.1038/sj.gt.3301914
- van der Loo, J. C., Swaney, W. P., Grassman, E., Terwilliger, A., Higashimoto, T., Schambach, A., . . . Malik, P. (2012). Scale-up and manufacturing of clinical-grade self-inactivating gamma-retroviral vectors by transient transfection. *Gene Ther*, 19(3), 246-254. doi: 10.1038/gt.2011.102
- Veiga, J. E., Araujo, N. O., & Cardozo, S. V. (2009). Terapia Génica - Uma revisão da literatura. *Saúde & Ambiente*, 4(2), 20-33.
- Volpers, C., & Kochanek, S. (2004). Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med*, 6 Suppl 1, S164-171. doi: 10.1002/jgm.496
- von Laer, D., Corovic, A., Vogt, B., Herwig, U., Roscher, S., Fehse, B., & Baum, C. (2000). Amphotropic and VSV-G-pseudotyped retroviral vectors transduce human hematopoietic progenitor cells with similar efficiency. *Bone Marrow Transplant*, 25 Suppl 2, S75-79.
- Wang, D. A., Narang, A. S., Kotb, M., Gaber, A. O., Miller, D. D., Kim, S. W., & Mahato, R. I. (2002). Novel branched poly(ethylenimine)-cholesterol watersoluble lipopolymers for gene delivery. *Biomacromolecules*, 3, 1197-1207.
- Wang, J., Hu, P., Zeng, M., Rabkin, S. D., & Liu, R. (2012). Oncolytic herpes simplex virus treatment of metastatic breast cancer. *Int J Oncol*, 40(3), 757-763. doi: 10.3892/ijo.2011.1266
- Wang, J., Voutetakis, A., Zheng, C., & Baum, B. J. (2004). Rapamycin control of exocrine protein levels in saliva after adenoviral vector-mediated gene transfer. *Gene Ther*, 11(8), 729-733. doi: 10.1038/sj.gt.3302225
- Ward, C. M., Read, M. L., & Seymour, L. (2001). Systemic circulation of poly(Llysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy. *Blood*, 97, 2221-2229.
- Warnock, J. N., Merten, O. W., & Al-Rubeai, M. (2006). Cell culture processes for the production of viral vectors for gene therapy purposes. *Cytotechnology*, 50(1-3), 141-162. doi: 10.1007/s10616-005-5507-z
- Wasungu, L., & Hoekstra, D. (2006). Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J Control Release*, 116(2), 255-264. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.06.024

- Wirth, T., & Yla-Herttuala, S. (2013). History of gene therapy. *Gene*. doi: 10.1016/j.gene.2013.03.137
- Wolfert, M. A., Dash, P. R., Nazarova, O., Oupicky, D., Seymour, L., Smart, S., Ulbrich, K. (1999). Polyelectrolyte vectors for gene delivery: influence of cationic polymer on biophysical properties of complexes formed with DNA. *Bioconjug Chem*, 10, 993-1004.
- Wolff, J. A., & Lederberg, J. (1994). An early history of gene transfer and therapy. *Hum Gene Ther*, 5(4), 469-480. doi: 10.1089/hum.1994.5.4-469
- Wright, J. F., Qu, G., Tang, C., & Sommer, J. M. (2003). Recombinant adeno-associated virus: formulation challenges and strategies for a gene therapy vector. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 6(2), 174-178.
- Xu, Z. N., Shen, W. H., Chen, H., & Cen, P. L. (2005). Effects of medium composition on the production of plasmid DNA vector potentially for human gene therapy. *J Zhejiang Univ Sci B*, 6(5), 396-400. doi: 10.1631/jzus.2005.B0396
- Yokozeki, H. (2012). [A Decoy Oligodeoxynucleotides therapy for allergic skin diseases]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 35(2), 107-111.
- Zhang, S., Xu, Y., Wang, B., Qiao, W., Liu, D., & Li, Z. (2004). Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J Control Release*, 100(2), 165-180. doi: 10.1016/j.jconrel.2004.08.019